

# **D i s s e r t a t i o n**

## **Charakterisierung molekularer und pathogenetischer Mechanismen einer isolierten Brachydaktylie Typ E auf der Grundlage der balancierten Translokation t(8;12)(q13;p11.2)**

**zur Erlangung des akademischen Grades**

**d o c t o r   r e r u m   n a t u r a l i u m**

**(Dr. rer. nat.)**

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

**Diplom - Biologe Philipp Georg Maaß**

(16.02.1979, Hannover)

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. C. Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. L. H. Schön

Gutachter:    1. Prof. Dr. T. Börner  
                  2. Prof. Dr. M. Bader  
                  3. Prof. Dr. F.C. Luft

eingereicht:                    20.04.2009

Datum der Promotion:        20.07.2009

## Abstrakt

In dieser Dissertation wurde eine isolierte Brachydaktylie vom Typ E (BDE) untersucht. Grundlage war eine Familie mit autosomal-dominanten Erbgang BDE. Der genetische Hintergrund ist eine balancierte Translokation  $t(8;12)(q13;p11.2)$ . Der Bruchpunkt auf derivativem Chromosom der(8) liegt 86 kb strangaufwärts des chondrogenetisch essentiellen Kandidatengens *PTHLH* (*Parathyroid hormone like hormone*). *PTHLH* ist für die Differenzierungsrate von proliferativen Chondrozyten verantwortlich. Positiv oder negativ reguliertes *Pthlh* führen zu einer Dysbalance mit Brachydaktylie-ähnlichen Phänotypen in murinen Tiermodellen. Der Leserahmen des Kaliumkanals *KCNB2* auf Chromosom 8 wurde durch die Translokation in Intron 2 getrennt. Chondrogenetische *KCNB2* Funktionen konnten durch *in situ* Hybridisierungen ausgeschlossen werden. Der Translokationsbruchpunkt auf der(8) liegt in einer in Mammalia hochkonservierten Region und beinhaltet ein Bindungsmotiv für AP1 Transkriptionsfaktoren. Durch die Translokation befindet sich in unmittelbarer Nähe eine Kernkonsensussequenz für ETS Transkriptionsfaktoren. AP1 und ETS Transkriptionsfaktoren interagieren und wurden auf eine potentielle *PTHLH* Regulation untersucht. Epigenetische Histonmodifizierungen, charakteristisch für cis-regulatorische Elemente, sowie Reporterergenassays mit AP1 und ETS1 Bindungsmotiven zeigten einen Bezug zur *PTHLH* Regulation. Bindungsassays mit AP1 und ETS1 Transkriptionsfaktoren an den Bruchpunktsequenzen, sowie funktionelle *in vitro* Experimente mit Chondrozyten verifizierten die Hypothese, dass der Translokationsbruchpunkt strangaufwärts von *PTHLH* regulatorische Eigenschaften besitzt. Die AP1 und ETS1 Transkriptionsfaktoren regulierten *PTHLH* positiv in ATDC5 und C28/I2 Chondrozyten. In chondrogeninduzierten Patientenfibroblasten war die *PTHLH* Expression inhibiert. Die molekulare Pathogenese der BDE wurde durch die bisher unbekannte chondrogene *PTHLH* Fehlregulation dargestellt.

*PTHLH*,

*IHH*,

*KCNB2*,

Translokation,

cis-regulatorisches Element,

Histonmodifikationen

AP1,

ETS1,

Brachydaktylie Typ E

## Abstract

We studied a 3-generation family with Brachydactyly Type E (BDE) and identified a t(8;12)(q13;p11.2) translocation. We identified *PTH1H* (Parathyroid hormone like hormone) on chromosome 12p11.2 and the ionchannel *KCNB2* on chromosome 8q13 as candidate genes. *KCNB2* was disrupted in intron 2, while the chromosome 12 breakpoint is localized 86 kb upstream of *PTH1H*; only the latter gene is involved in chondrogenesis. The 12p11.2 breakpoint is conserved and features an AP1 binding site 86 kb upstream of *PTH1H*. Due to the translocation, an ETS binding site from 8q13 resided near the AP1 site. Since both transcription factors interact, we tested if AP1 and ETS1 can activate *PTH1H* in ATDC5 and C28/I2 chondrocytes. We used the breakpoint sequences of the derivative chromosomes 8 and 12 and the nonaffected chromosome 8 and 12 allele sequences in reporter-gene assays. Reporter-gene constructs containing the der(8) breakpoint revealed activation in murine and human chondrocytes. The enrichment of histone modifications, implicating cis-regulatory effects were investigated in the breakpoint area. We found the enriched histone H3K4me1 modification at the chromosome 12 breakpoint position in murine and human chondrocytes, while affected fibroblasts showed higher H3K4me1 enrichment at the der(8) breakpoint compared to wt(12) allele. Furthermore, the breakpoint sequence bound to AP1 and C-ets-1 in EMSA. Western blotting after PMA-stimulated AP1 and ETS1 activation and overexpression of different AP1 and ETS1 combinations showed activated PTHrP expression in chondrocytes. In chondrogenic induced BDE fibroblasts *PTH1H* was inhibited, while IHH was upregulated. We suggest that *PTH1H* was dysregulated by the translocation in BDE chondrocytes. This could lead to BDE. We highlight the impact to characterize genomic breakpoints in detail and demonstrate a novel AP1- and ETS1-directed chondrogenic *PTH1H* regulation in wild-type chondrocytes and dysregulation in the pathogenesis of BDE.

*PTH1H*,

*IHH*,

*KCNB2*,

translocation,

cis-regulatory element,

histone modification,

AP1,

ETS1,

Brachydactyly Type E

## INHALT

<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>10</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>14</b>
<b>1.1 EMBRYONALENTWICKLUNG</b>	<b>14</b>
1.1.1 DIE SPEZIFIZIERUNG DES MESODERMS IN AXIALES UND APPENDIKULARES SKELETT UND DIE KONDENSATION MESENCHYMALER ZELLEN	15
1.1.2 DIFFERENZIERUNG DER GLIEDMAßENKNOSPE	16
1.1.3 KNORPELMATRIX	17
<b>1.2 DIE ENCHONDRALE OSSIFIKATION</b>	<b>18</b>
1.2.1 DIFFERENZIERUNGSSTADIEN WÄHREND DER ENCHONDRALEN OSSIFIKATION	18
1.2.2 <i>PTHLH</i> / <i>IHH</i> UND FGF / BMP SIGNALTRANSDUKTIONEN IN DER CHONDROZYTENDIFFERENZIERUNG	20
1.2.3 POSTCHONDROGENE ENTWICKLUNGSSTADIEN	23
<b>1.3 DEFekte WÄHREND DER ENCHONDRALEN OSSIFIKATION</b>	<b>25</b>
1.3.1 RADIOLOGISCHE MERKMALE DER BRACHYDAKTYLIEN A-E	25
1.3.2 MOLEKULARE URSACHEN BEI MONOGENEN BRACHYDAKTYLIE – FORMEN	26
<b>1.4 CHROMOSOMENANOMALIEN</b>	<b>28</b>
1.4.1 MOLEKULARE PATHOGENESE DER TRANSLOKATION	28
<b>1.5 GENREGULATION</b>	<b>31</b>
1.5.1 DIE BEDEUTUNG KONSERVIERTER CIS-REGULATORISCHER ELEMENTE (CRE)	31
1.5.2 HISTONMODIFIKATIONEN	34
<b>1.6 GRUNDLAGE DES PROJEKTES</b>	<b>36</b>
AUTOSOMAL-DOMINANTE TRANSLOKATION T(8;12)(q13;p11.2)	36
1.6.1 TAB. 1: KLINISCHE MERKMALE DER FAMILIE MIT TRANSLOKATION T(8;12)	36
1.6.2 TAB. 2: RADIOLOGISCHE MERKMALE DER FAMILIE MIT TRANSLOKATION T(8;12)	37
<b>1.7 ZIELE</b>	<b>38</b>

<b>2.</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>39</b>
2.1	ANTIKÖRPER UND REKOMBINANTE PROTEINE	39
2.2	CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	39
2.3	ENZYME	42
2.4	GERÄTE UND LABORHILFSMITTEL	42
2.5	KITS	43
2.6	KOMPETENTE <i>E. COLI</i> ZELLEN	43
2.7	PLASMIDVEKTOREN	44
2.8	SOFTWARE / INTERNETSEITEN	44
2.9	VERBRAUCHSMATERIALIEN	45
2.10	ZELLEN	45
2.11	ZELLKULTURMEDIENTEN UND –ZUSÄTZE	45
<b>3.</b>	<b>METHODEN</b>	<b>46</b>
<b>3.1</b>	<b>ZELLBIOLOGISCHE METHODEN</b>	<b>46</b>
3.1.1	ZELLKULTUR	46
3.1.1.1	ARBEITEN MIT ZELLINIEN	46
3.1.1.2	KULTIVIERUNG UND KRYOKONSERVIERUNG	46
3.1.1.3	BESTIMMUNG DER ZELLZAHL NACH NEUBAUER	47
3.1.1.4	ALZIANBLAU UND SAFRANIN O FÄRBUNG	47
3.1.1.5	CHROMATINPRÄPARATION FÜR CHROMATIN - IMMUNOPRÄZIPITATION (CHIP)	47
3.1.2	FUNKTIONALE ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	48
3.1.2.1	TRANSIENTE TRANSFEKTION	48
3.1.2.2	DUALER LUZIFERASE-REPORTERGEN- <i>ASSAY</i>	49
<b>3.2</b>	<b>BIOINFORMATISCHE METHODEN</b>	<b>50</b>
3.2.1	OLIGONUKLEOTIDDESIGN	50
3.2.2	SONDENGENERIERUNG FÜR <i>SOUTHERNBLOTTING</i>	50
3.2.3	PHYSIKALISCHE KARTIERUNG DURCH RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN VON 12P11.2 UND 8Q13	50
3.2.4	EVOLUTIONÄRE DNA KONSERVIERUNG UND IDENTIFIKATION PUTATIVER CIS-AKTIVER REGULATOREN	51

<b>3.3</b>	<b>HYBRIDISIERUNGSMETHODEN</b>	<b>52</b>
3.3.1	<i>SOUTHERNBLOTTING</i> MIT $^{32}\text{P}$ – MARKIERTEN SONDEN UND STRIPPEN VON <i>SOUTHERNBLOT</i> MEMBRANEN	52
3.3.2	CHROMATIN – IMMUNOPRÄZIPITATION (CHIP)	53
3.3.3	METAPHASE-FISH (FLUORESCENZ <i>IN SITU</i> HYBRIDISIERUNG) DURCH BAC HYBRIDISIERUNGEN	55
3.3.4	<i>IN SITU</i> HYBRIDISIERUNG (ISH)	55
3.3.5	WHOLE MOUNT <i>IN SITU</i> HYBRIDISIERUNG	56
<b>3.4</b>	<b>MIKROBIOLOGISCHE METHODEN</b>	<b>58</b>
3.4.1	TRANSFORMATION	58
3.4.2	BLAU – WEIß – SELEKTION TRANSFORMIERTER BAKTERIENKOLONIEN	58
3.4.3	TOPO TA-KLONIERUNG <sup>®</sup> VON PCR PRODUKTEN	58
3.4.4	TRANSFORMATION VON <i>TOP10</i> , <i>TOP10F</i> , <i>OMNIMAX 2 T1 PHAGE-RESISTANT</i> UND <i>DAM<sup>-</sup>/DCM<sup>-</sup></i> CHEMISCH KOMPETENTEN <i>E. COLI</i> ZELLEN	59
3.4.5	TRANSFORMATION VON XL10 GOLD UND SURE2 CHEMISCH ULTRAKOMPETENTEN <i>E. COLI</i> ZELLEN	60
3.4.6	PLASMID-PRÄPARATION: MINI / ENDOTOXINFREIE MAXI	60
<b>3.5</b>	<b>MOLEKULARGENETISCHE METHODEN</b>	<b>61</b>
3.5.1	POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) TECHNIKEN	61
3.5.2	PCR BEDINGUNGEN	62
3.5.3	cDNA SYNTHESE VON ISOLIERTER TOTAL-RNA	62
3.5.4	REALTIME PCR MIT SYBR GREEN	63
3.5.5	RAPID AMPLIFICATION OF cDNA ENDS (RACE)	63
3.5.6	DNA SEQUENZIERUNG	63
3.5.7	ETHANOL PRÄZIPITATION / AUFREINIGUNG DER SEQUENZREAKTION	64
3.5.8	PRÄPARATION HOCHMOLEKULARER DNA	65
3.5.9	PRÄPARATION HOCHMOLEKULARER DNA IN AGAROSEBLÖCKEN FÜR PULSFELDGELELEKTROPHORESE	65
3.5.10	RNA PRÄPARATION AUS HUMANEN UND TIERISCHEN ZELLEN DURCH TRIZOL	66
3.5.11	FRAGMENTIERUNG HOCHMOLEKULARER DNA IN AGAROSEBLÖCKEN DURCH RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN	67
3.5.12	FRAGMENTIERUNG HOCHMOLEKULARER DNA IN WASSER DURCH RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN	67
3.5.13	PHENOL / CHLOROFORM – AUFREINIGUNG	67

3.5.14	RNASE A BEHANDLUNG	68
3.5.15	AGAROSEGELELEKTROPHORESE	68
3.5.16	PULSFELDGELELEKTROPHORESE (PFGE) DURCH CHEF METHODE ( <i>CLAMPED – HOMOGENOUS ELECTRIC FIELD</i> )	68
3.5.17	GELEXTRAKTION VON DNA FRAGMENTEN	69
3.5.18	LIGATION VON PLASMIDVEKTOREN UND RESTRIKTIONSFRAGMENTEN	69
3.5.19	DIG-RNA-SONDEN ZUR <i>IN SITU</i> HYBRIDISIERUNG (ISH) FÜR MURINES <i>KCNB2</i>	71
3.5.20	3' BIOTIN-MARKIERUNG VON OLIGONUKLEOTIDEN FÜR EMSA ( <i>ELECTROMOBILITY SHIFT ASSAY</i> )	71
3.5.21	NICK TRANSLATION FÜR BAC-SONDEN	71
<b>3.6</b>	<b>PROTEINANALYTISCHE METHODEN</b>	<b>72</b>
3.6.1	HERSTELLUNG VON PROTEINLYSATEN AUS ZELLINIEN	72
3.6.2	PROTEINBESTIMMUNG FÜR SDS-PAGE	72
3.6.3	SDS-PAGE (SODIUM-DODEZYL-SULFAT-POLY-AKRYLAMID-GEL-ELEKTROPHORESE)	72
3.6.4	IMMUNOBLOT ( <i>WESTERNBLOTTING</i> )	73
3.6.5	EMSA (ELECTRO MOBILITY SHIFT ASSAY)	75
<b>3.7</b>	<b>STATISTIK</b>	<b>76</b>
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>77</b>
<b>4.1</b>	<b>KARTIERUNG DER TRANSLOKATION T(8;12) (Q13,P11.2)</b>	<b>77</b>
4.1.1	METAPHASE-FISH ZUR KARTIERUNG DER BRUCHPUNKTREGION	77
4.1.1.1	CHROMOSOM 12P11.2	77
4.1.1.2	CHROMOSOM 8Q13	78
4.1.2	KANDIDATENGENSUCHE AUF CHROMOSOM 12P11.2 BZW. 8Q13	78
4.1.3	PHYSIKALISCHE KARTIERUNG DURCH RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN	79
4.1.4	REDUKTION DER KRITISCHEN BRUCHPUNKTREGIONEN DURCH PULSFELD-, MAXI-GELELEKTROPHORESE UND <i>SOUTHERNBLOTTING</i>	82
4.1.4.1	CHROMOSOM 12P11.2	82
4.1.4.2	CHROMOSOM 8Q13	83
<b>4.2</b>	<b>SEQUENZANALYSE DER BRUCHPUNKTE</b>	<b>84</b>
4.2.1	SEQUENZIERUNG DER BRUCHPUNKTE	84
4.2.2	GENETISCHE NEUORDNUNG IM BEREICH DER TRANSLOKATIONSBRUCHPUNKTE	84

4.2.3	<i>IN SILICO</i> SEQUENZANALYSE DER BRUCHPUNKTE FÜR BINDUNGSMOTIVE MODIFIZIERENDER ENZYME	85
4.2.4	<i>IN SILICO</i> IDENTIFIKATION DER SPEZIESKONSERVIERUNG UND DER TRANSKRIPTIONSFAKTORBINDUNGSSTELLEN (TFBS) AN BRUCHPUNKTEN DER(8) UND DER(12)	86
<b>4.3</b>	<b>POTENTIELLE FUNKTIONEN VON <i>KCNB2</i> IN DER CHONDROGENESE</b>	<b>88</b>
4.3.1	<i>KCNB2</i> <i>IN SITU</i> HYBRIDISIERUNG	88
4.3.2	<i>KCNB2</i> WHOLE MOUNT <i>IN SITU</i> HYBRIDISIERUNG	90
<b>4.4</b>	<b>PUTATIVE FUSIONSTRANSKRIPTE UND KANDIDATENGENEXPRESSION IN MURINEN UND HUMANEN CHONDROZYTEN, SOWIE PATIENTEN-FIBROBLASTEN</b>	<b>91</b>
4.4.1	<i>PTHLH</i> – <i>KCNB2</i> EXPRESSION IN FIBROBLASTEN	91
4.4.2	PUTATIVE <i>PTHLH</i> – <i>KCNB2</i> FUSIONSTRANSKRIPTE	91
4.4.3	C28/I2 ZELLWAHL UND DIE EXPRESSION KNORPELSPEZIFISCHER MARKER IN DIFFERENZIIERTEN ATDC5 ZELLEN	91
4.4.4	5' RACE PCR ZUR BESTIMMUNG DER <i>PTHLH</i> PROMOTORREGION IN MURINEN UND HUMANEN CHONDROZYTEN	93
<b>4.5</b>	<b>NACHWEIS DER CIS-AKTIVEN <i>PTHLH</i> REGULATORFUNKTION VON BRUCHPUNKT DER(8)</b>	<b>95</b>
4.5.1	CHROMATIN IMMUNOPRÄZIPITATION (ChIP) ZUR UNTERSUCHUNG DER HISTONMODIFIKATION	95
4.5.2	REPORTERASSAYS ZUR EVALUIERUNG DER CIS-AKTIVEN BRUCHPUNKTSEQUENZ	97
4.5.3	C-JUN UND C-ETS-1 INTERAKTION MIT DEN BRUCHPUNKTSEQUENZEN IM EMSA	99
4.5.4	C-JUN, C-ETS-1 UND PTHRP DETEKTION AUF PROTEINEBENE NACH PMA STIMULATION IN ATDC5 UND C28/I2 ZELLEN	99
4.5.5	PMA-UNABHÄNGIGE PTHRP-AKTIVIERUNG DURCH ÜBEREXPRESSION VON TRANSFIZIERTEN <i>JUN</i> , <i>JUNB</i> , <i>FOS</i> UND <i>ETS1</i>	101
4.5.6	<i>PTHLH</i> QUANTIFIZIERUNG IN CHONDROGEN INDUZIERTEN FIBROBLASTEN	103
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>105</b>
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>118</b>
<b>7.</b>	<b>ABSTRACT</b>	<b>119</b>



<b>8.</b>	<b>REFERENZEN</b>	<b>120</b>
<b>9.</b>	<b>ANHANG OLIGONUKLEOTIDE</b>	<b>165</b>
9.1	TAB. 3: SONDENPRIMER FÜR <i>SOUTHERNBLOTTING</i>	165
9.2	TAB. 4: PRIMER FÜR PUTATIVES FUSIONSTRANSKRIFT VON <i>PTHLH</i> EXONS MIT EXON 1 UND/ODER 2 VON <i>KCNB2</i>	166
9.3	TAB. 5: PRIMER FÜR 5' RACE AN ATDC5 UND C28/I2 ZELLEN	166
9.4	TAB. 6: PRIMER MIT SPE I UND SAC I RESTRIKTIONSORTEN FÜR <i>PTHLH</i> – REGULATOR – REPORTERGENKONSTRUKTE	167
9.5	TAB. 7: PRIMER ZUR QUANTIFIZIERUNG CHONDROGENER GENEXPRESSION MITTELS QPCR	167
9.6	TAB. 8: PRIMER FÜR POSITIV-, NEGATIVKONTROLLEN UND SPEZIFISCHE NACHWEISE VON CHROMATIN IMMUNOPRÄZIPITATIONEN	168
9.7	TAB. 9: OLIGONUKLEOTIDE FÜR EMSA	169
<b>10.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>170</b>
<b>11.</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>172</b>

## Abkürzungen

$\infty$	unendlich
'	Minute
''	Sekunde
3', 5'	Orientierung eines DNA / RNA Stranges; am 3. Kohlenstoff der Desoxyribose ist eine Hydroxyl-Gruppe, am 5. Kohlenstoffatom eine Phosphatgruppe
$\alpha$ -dCTPs <sup>32</sup> P	<sup>32</sup> Phosphor-markiertes Desoxycytosintriphosphat
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ad	lat.: bis zu, bis auf
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua bidest	zweifach destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
bp	<i>base pair</i> (Basenpaar)
BP	Bruchpunkt eines derivativen Chromosoms
Bq	Becquerel
BSA	<i>Bovines Serum Albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
bspw.	beispielsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celcius
c	<i>cell</i> (Zelle)
Chr.	Chromosom
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CCD	<i>Charged – Coupled Device</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>
cfu	<i>colony forming units</i>
CoA	<i>Coenzyme A</i> (Koenzym A)
<i>Contig</i>	Genomische Region aus überlappenden DNA Stücken
CRE	cis-regulatorisches Element
CTP	Cytosintriphosphat
cycl.	Zyklus einer PCR
ddNTP	Didesoxynukleotid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
D – Luciferin	4,5 – Dihydro – 2 – [6 – hydroxy – 2 – benzothiazolyl] – 4 – thiazolecarboxyl Säure

DMEM	<i>Dulbecco 's modified Eagles Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ds	<i>double strand</i> (doppelsträngig)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-Aminoäthylether)-N,N,N',N' tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EMEM	<i>Earle 's Minimum Essential Medium</i>
Ext.	Extensionszeit am Ende eines PCR Zyklus
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (fötales Kälberserum)
fw	<i>forward</i> Primer
G	Guanin
g	Gramm / Gravitationskonstante (9,81 m/s <sup>2</sup> )
GTT	Guanidintriphosphat
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HRP	<i>Horse Radish Peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaar
kBq	Kilo Becquerel
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
λ	griech.: <i>lambda</i> = Wellenlänge
l	Liter
LB Medium	Luria – Bertani Medium
LCL	<i>Lymphoblastoid Cellline</i>
LRM	<i>Low Range Marker</i> (Molekulargewichtsmarker)
LSC	<i>Liquid Scintillation Counter</i>
M	Molar
m	Meter
mA	Milliampere
Mb	Megabase
mba	Millibar

## Abkürzungen

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
Mg <sup>2+</sup>	Magnesiumion
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
µM	Mikromolar
MW	Mediumwechsel
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	di – Natriumhydrogenphosphat
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Natriumsulfat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nmol	Nanomol
NP-40	Nonidet P40
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
o/n	<i>over night</i> (über Nacht)
p	kurzer Arm eines Chromosoms
pA	Poly A Signal
PAC	P1 Phage <i>Artificial Chromosome</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
pCA	Poly Cytosin-Adenosin Primer
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pg	Pikogramm
pGT	Poly Guanidin-Thymidin Primer
pH Wert	<i>potentia hydrogenii</i> → Wasserstoffionenkonzentration
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
P/S	Penizillin / Streptomycin
q	langer Arm eines Chromosoms
RCF	<i>Relativ Centrifugal Force</i>

rDNA	ribosomale Nukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
rv	<i>reverse</i> Primer
S	Svedberg Konstante ribosomaler Untereinheiten
s.	siehe (gucksch Du!)
s <sup>2</sup>	Sekunde im Quadrat
SDS	<i>Sodium Docecylsulfate</i> (Natriumdodezylsulfat)
SDS PAGE	SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese
sec	<i>Second</i> (Sekunde)
SFM	serumfreies Medium
SOC Medium	Derivat von SOB ( <i>super optimal broth</i> )-Medium
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris- <i>Acetic acid</i> -EDTA Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-ETDA Puffer
TBST	Tris-Borat-Saline-Tween 20 Puffer
TE	Tris-ETDA Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TFBS	Transkriptionsfaktorbindungsstelle
Trizma Base	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
U	<i>Unit</i>
ÜNK	Übernachtkultur
V	Volt / Version
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VM	Vollmedium
WB	<i>Western Blot</i>
X - Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
YAC	<i>Yeast Artificial Chromosome</i>

Gene, sowie englisch- und lateinsprachige Ausdrücke sind *kursiv* geschrieben

## **1. Einleitung**

Die nichtkodierende DNA Sequenz mit einem genomischen Anteil von mehr als zwei Milliarden Basen ist Gegenstand aktueller genetischer Forschung. Sinn und Funktion intergenischer Sequenz werden aufgeklärt und geben Einblicke in die Evolution, die Entwicklung und das Leben eines Organismus.

Spezifische genetische und nukleäre Regulationsmechanismen stellen bei der Transkription komplexe Vorgänge dar, die sich individuell und speziesspezifisch unterscheiden. Grundlage vieler molekularbiologischer Fragestellungen sind Erbkrankheiten, die als Modell bei der Erforschung genomischer, transkriptomischer und proteomischer Prozesse dienen. Die Erforschung genetischer Grundlagen und biologischer Mechanismen, die an der molekularen Pathogenese eines Phänotyps beteiligt sind, sowie das Verständnis systemischer Interaktionen in komplexen Prozessen eines Organismus, sind die Voraussetzungen für neue Ansätze zur individuellen Diagnose, prognostischen Abschätzung und potentiellen Therapie von Erkrankungen.

Diese Dissertation beschreibt molekulare Mechanismen einer balancierten Translokation, die durch aberrante Genregulation, vornehmlich während des chondrogenetischen Stadiums der Embryonalentwicklung, pathogenetisch eine autosomal-dominant vererbte Brachydaktylie Typ E bedingen.

### **1.1 Embryonalentwicklung**

Alle Wirbeltierembryonen durchlaufen ähnlich das phylotypische Stadium, das in drei Abschnitte gegliedert wird. Der Aufbau der Hauptkörperachsen mit der antero-posterioren und der dorso-ventralen Achse steht am Anfang der Embryonalentwicklung [1]. Die Spezifizierung der drei Keimblätter, des Entoderms, aus dem sich der Gastrointestinaltrakt und seine Derivate wie Leber und Lungen entwickeln, des Mesoderms, aus dem Chorda, Skelettelemente, Muskeln, Bindegewebe, Nieren und Blut gebildet werden und des Ektoderms, das die Epidermis, das Gehirn und das Rückenmark, sowie die Neuralleiste hervorbringt, bezeichnet man als zweite Entwicklungsstufe.

Die dritte Stufe beginnt mit der Musterbildung der Keimblätter, insbesondere des Mesoderms, sowie der frühen Organisation des neuronalen Systems [2].

Zusätzlich zu den Hauptkörperachsen besitzen Wirbeltiere eine bilaterale Symmetrie, so daß viele Strukturen paarweise zu beiden Seiten der Mittellinie auftreten [3].

### 1.1.1 Die Spezifizierung des Mesoderms in axiales und appendikulares Skelett und die Kondensation mesenchymaler Zellen

Das Mesoderm bildet Somiten aus, die sich vom vorderen Kopfende nach hinten fortsetzen. Somiten sind transiente Organisationsstrukturen des sich entwickelnden Embryos zu beiden Seiten des Neuralrohres. Sie bestehen aus epithelialen Zellen, die aus dem paraxialen Mesoderm hervorgehen und werden gleichzeitig und paarweise gebildet [2, 4]. In den dorsalen und lateralen Bereichen eines neu entstandenen Somiten bilden Zellen das sogenannte Dermamyotom, das für die Entwicklung von Muskel- und Hautzellen verantwortlich ist (s. Abb. 1). Der ventrale Bereich eines Somiten enthält Sklerotomzellen, die ventral wandern, wo sie die Chorda umgeben und sich zu Wirbeln entwickeln. Das Sklerotom ist der Ausgangspunkt für die Bildung des axialen Skeletts und wird durch das Hauptsignal des Morphogens *Sonic Hedgehog (SHH)* initiiert und kontrolliert [2, 4, 5].

Das appendikulare Skelett leitet sich von mesenchymalen Zellen ab, die aus dem lateralen Plattenmesoderm stammen. Die meisten Schädelknochen stammen aus dem Neuralkamm. Mesenchymale Zellen, bedeckt von Ektoderm, entwickeln die Extremitätenknospe. In den meisten Tetrapoden läuft dieser Prozeß nahezu gleich ab. Ausgehend von der embryonalen Flanke entwickeln sich zwei Paare von Vorläuferstrukturen, die sogenannten *Primordia* zu vorderen und hinteren Gliedmaßen. Diese sogenannte *limb induction* beinhaltet einerseits die Abgrenzung von interagierenden und proliferierenden Zellen des Plattenmesoderms und anderen Bereichen des Embryos, und andererseits den Transfer von Positionsinformationen zwischen den unterschiedlichen Geweben und Strukturen [1, 3].

Mesenchymale Zellen differenzieren, um verschiedene Gewebe der Extremität in proximal-distaler Richtung aus der Gliedmaßenknospe zu bilden. Undifferenzierte Zellen am Ende der Knospe bilden die *progress zone (PZ)* [6]. Die positionelle Identität und die Differenzierung jeder Zelle werden durch ein dreidimensionales Koordinatensystem gesteuert, das aus dorso-ventraler, proximal-distaler und antero-posteriorer Achse besteht [7]. Jede dieser Achsen wird von speziell differenzierten Zellen und spezifischen Signalmolekülen und –transduktionen kontrolliert. Diesbezüglich wurden 3 Signalregionen identifiziert: Das *apical ectodermal ridge (AER)*, das den Auswuchs der Knospe in proximal-distaler Richtung steuert, das Ektoderm, das die Seiten der Knospe bedeckt und für die dorsoventrale Musterbildung verantwortlich ist und die *zone of polarizing activity (ZPA)*, die das antero-posteriore Muster kontrolliert (s. Abb. 1) [4, 8, 9, 10, 11].

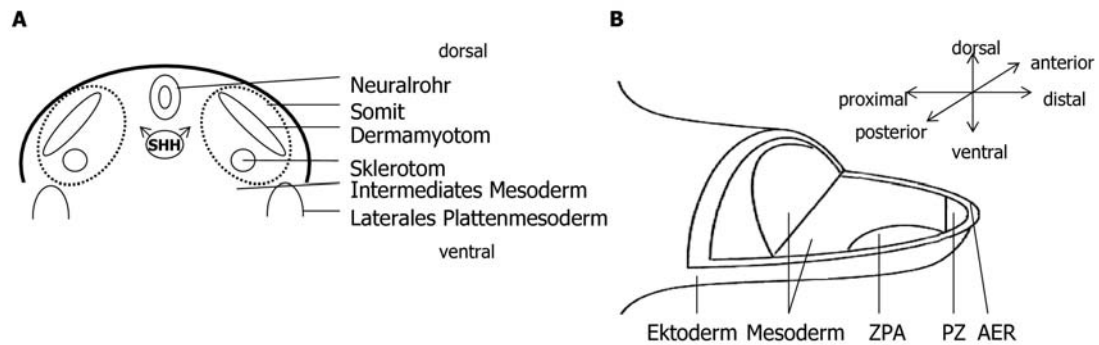


Abb. 1: A: Initiale Organisationsstruktur in der Embryonalentwicklung zur Spezifizierung des Mesoderms, B: Kondensation mesenchymaler Zellen und Differenzierung der Gliedmassenanlage in ZPA (zone of polarizing activity), PZ (progress zone) und AER (apical ectodermal ridge), verändert nach [12]

### 1.1.2 Differenzierung der Gliedmaßenknospe

Das AER ist eine anatomische Struktur aus kondensierten ektodermalen Zellen im vorderen Bereich der Gliedmaßenknospe. Es bildet sich in der Grenzfläche zwischen *radical fringe* (*RFNG* *O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase*)-exprimierenden Zellen und *RFNG*-nichtexprimierenden Zellen (zwischen dorsalem und ventralem Ektoderm) [13, 14]. Inhibitor und Garant der Grenzfläche ist der Transkriptionsfaktor *engrailed-1* (*EN-1*), der außerdem die Expression von *wingless-type MMTV integration site family, member 7A* (*WNT-7a*) reprimiert [15, 16, 17]. Das Tumor-Protein p63 ist essentiell für die Aufrechterhaltung des AER [4, 18, 19] (s. Abb. 2).

*Fibroblast growth factors* (*FGF*) werden exprimiert, sezerniert und steuern die mesenchymale Zellproliferation und den Auswuchs der Extremität [9, 20]. Ektodermale Zellen migrieren lateral beim Auswuchs der Knospe, um das Mesenchym weiter zu bedecken [3, 21].

Die ZPA ist das Mesenchym am posterioren Rand der Knospe. *SHH* wird exprimiert, gilt als stärkster Mediator der antero-posterioren Musterbildung und ist für die Aufrechterhaltung des AER zuständig [22]. Durch den Einfluß von *SHH* wird der Repressor des Transkriptionsfaktors *GLI3*, *GLI3R*, in die aktive Form *GLI3A* überführt, wodurch es zum Aufbau eines *SHH* Gradienten und zur weiteren *GLI3* Expression kommt [23, 24]. Es folgt die zeitlich und räumlich festgelegte Expression von *HOXD* Cluster Genen [4]. *HOX* Gene kodieren für Homeodomäne beinhaltende Transkriptionsfaktoren der Cluster A bis D (39 humane Isoformen) und bestimmen die Form und Identität der individuellen Skelettelemente [25, 26].

Der sezernierte Transkriptionsfaktor *WNT-7a*, exprimiert im dorsalen Ektoderm, kontrolliert das dorso-ventrale Muster und die mesenchymale Expression von Homeodomäne-Transkriptionsfaktor *LMX-1*, der den dorsoventralen Gradienten bildet [3, 27, 28] (s. Abb. 2).



Der Auswuchs der Gliedmaßen und die Proliferation der Zellen in der PZ resultieren aus den im AER exprimierten *FGF2*, *4* und *8*. Die PZ ist eine Region aus undifferenzierten mesenchymalen Zellen, die *FGF10* exprimieren (s. Abb. 2) [6, 20, 21] .

*FGF8* gilt als Mediator der Induktion der *limb induction* der vorderen und hinteren Gliedmaßen aus dem intermediären Mesoderm (IM) heraus [3, 29, 30].

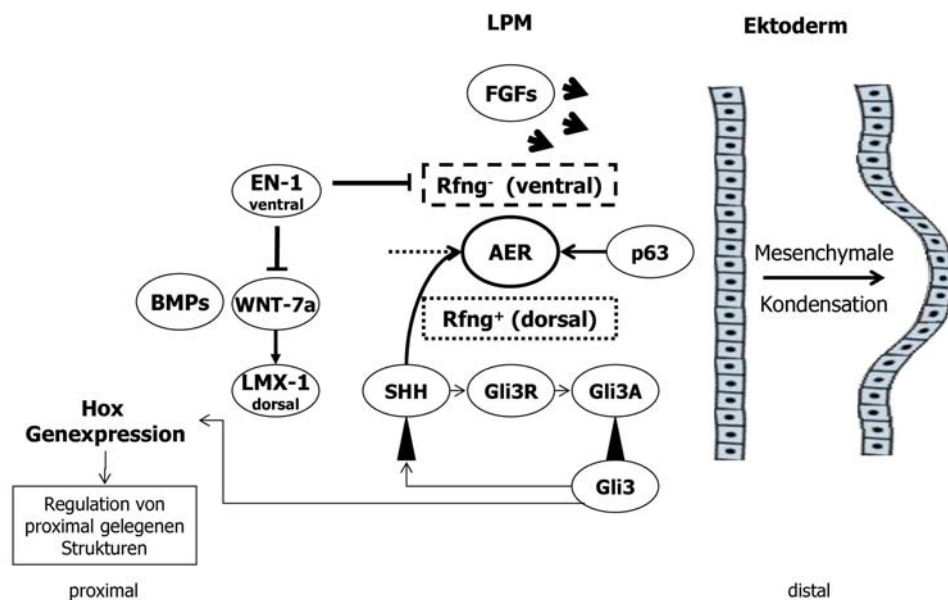


Abb. 2: Hauptregulatoren mesenchymaler Zellkondensationen zur Bildung und Aufrechterhaltung der Differenzierungs-zonen und für den Auswuchs der Gliedmaßenknospe

### 1.1.3 Knorpelmatrix

Knorpel besteht in der *Extracellular Matrix* (ECM) neben Proteoglycanen und Glykoproteinen aus Kollagenen, die einen großen Bruchwiderstand verleihen. In ruhenden und proliferierenden Chondrozyten überwiegt die Produktion von Kollagen Typ II (*COL2A1*), das mit Typ IX und XI Fasern bilden kann. Typ X Kollagen (*COL10A1*) hingegen ist spezifisch für hypertrophes Knorpelgewebe. Proteoglycane haben eine gelartige Konsistenz. Sie bestehen aus einem *Core* Protein, an das verschiedene Glycosaminoglykane (GAG) gekettet sind. Gebundene negativgeladene Sulfatgruppen binden Kationen und Wassermoleküle, die sich gegenseitig abstoßen, was die elastische Eigenschaft des Knorpels ausmacht. [4, 31] .

## 1.2 Die Enchondrale Ossifikation

### 1.2.1 Differenzierungsstadien während der enchondralen Ossifikation

Der Hauptteil des Skeletts wird durch die enchondrale Ossifikation gebildet, wobei ein Knorpelgerüst als Vorlage dient und durch Knochen ersetzt wird. Für das longitudinale Wachstum ist die Bildung einer Wachstumsplatte Voraussetzung.

Wenn die Musterbildung beendet ist, migrieren mesodermale Zellen zu den späteren Zentren der Skelettentwicklung und aggregieren zu mesenchymalen Kondensationen, die sogenannten Anlagen oder Knorpel Elemente werden gebildet. Dies wird sowohl beim fetalen, als auch postnatalen Wachstum als enchondrale Ossifikation bezeichnet. Verknöcherungen des Schädels und des Schlüsselbeines werden als intramembranöse oder desmale Ossifikation bezeichnet [1, 4] .

Auf drei verschiedene Arten wird das Skelett entwickelt. Somiten bilden das Achsenskelett (mittig), das laterale Plattenmesoderm bildet die Extremitäten aus und der kraniale Neuralkamm entwickelt den Branchialbogen, sowie Gesichtsknochen und Knorpel [2] .

Die mesenchymalen Kondensationen gleichen dem späteren Skelett in der Form. Üblich ist die Ausbildung von mehr als einem Knochen oder Knorpel aus einer Kondensation während des ersten Stadiums. Der Transkriptionsfaktor *SRY (sex determining region Y)-box 9 (SOX9)* ist für die Formation der kondensierten Zellen notwendig, *SOX5* und *SOX6* werden für die Differenzierung der kondensierten Zellen in Chondrozyten benötigt [32, 33, 34, 35, 36, 37] . Im Außenbereich der Kondensationen wird der sich entwickelnde Knorpel von einer dünnen Zellschicht, dem sogenannten Perichondrium, umgeben. Signalwege von Chondrozyten und Perichondrium interagieren, um die Differenzierung der Anlage zu steuern [38] .

Extrazelluläre Matrixmoleküle wie Versican, Tenascin, Syndecan, Heparansulfat und Chondroitinsulfat werden von proliferierenden Chondrozyten in der Epiphysenfuge stark exprimiert.

Die Zellen differenzieren im zweiten Stadium zu Chondrozyten in den enchondralen Skelettelementen oder knochenbildenden Osteoblasten in membranösen Skelettelementen.

*SOX9* reguliert *SOX5* und *6*, sowie die Expression des knorpeltypischen Hauptkollagens 2A1 (*COL2A1*), durch spezifische Bindung an Sequenzen im ersten Intron [39, 40, 41] . Bei der Regulation der Kondensation und Differenzierung von Vorläuferzellen in Chondrozyten sind Kaskaden der *Transforming Growth Factor-β (TGF-β)* und *Bone Morphogenetic Protein (BMP)* Signaltransduktionen involviert [15, 42] .

Die Gelenkentwicklung erfolgt durch Zellaggregate an den Positionen der späteren Gelenke, wobei hier die Chondrogenese unterdrückt wird. Ein Mitglied der WNT-Familie, *WNT-14a*,  
18

sowie Mitglieder der BMP Familie (*GDF5*) sind für die Induktion der Gelenkbildung verantwortlich [43, 44, 45] .

In der dritten Phase proliferieren die Chondrozyten rapide. Sie bilden die Form des späteren Knochens und sezernieren eine knorpelspezifische extrazelluläre Matrix. Postmitotisch ändern die Chondrozyten ihre Morphologie und biologischen Eigenschaften. In der prähypertrophen Zone sind die Chondrozyten abgeflacht und in Säulen entlang der Längsrichtung des Knochens ausgerichtet (kolumnare Chondrozyten). Die Chondrozytendifferenzierung wird durch den Transkriptionsfaktor *runx-related transcription factor 2* (*Runx2* od. *Cbfa1*) kontrolliert und reguliert. Die Expression erfolgt in prähypertrophen Chondrozyten. Die konstitutive Expression in nichthypertrophen Chondrozyten induziert die hypertrophe Differenzierung und enchondrale Ossifikation [46, 47, 48, 49] .

Während der weiteren Chondrozytendifferenzierung im vierten Stadium expandiert das Volumen der Zellen, die Mitose wird arretiert [2, 31] . Die Zone des hypertrophen Knorpels besteht aus großen runden Zellen und wenig ECM. Parallel zur hypertrophen Zone differenzieren Zellen im Perichondrium in Knochenmatrix-produzierende Osteoblasten im sogenannten Periosteum (s. Abb. 3). Signalwege während der hypertrophen Chondrozyten- und Periosteumsdifferenzierung interagieren miteinander und unterliegen einer wechselseitigen Regulation [38] . Außerdem regulieren sie die Proliferationsrate und Konversion proliferierender Chondrozyten in hypertrophe Chondrozyten.

Während der Chondrozytendifferenzierung verändert sich die gesamte extrazelluläre Matrixkomposition. Die produzierte Matrix wird durch den Zusatz von Kollagen X und Fibronectin verändert, wodurch sie durch Calciumcarbonat mineralisiert werden kann und Knochen entsteht. Die vollständig ausdifferenzierten Chondrozyten gehen in Apoptose und werden von Chondroklasten, einem Osteoklasten-Subtyp entfernt [38] .

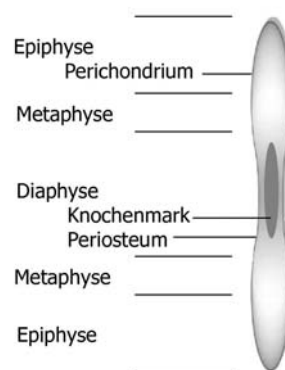
In der fünften Phase invadieren Blutgefäße das hypertrophe Knorpelmodell, hypertrophe Chondrozyten begehen Apoptose bzw. werden durch Osteoblasten ersetzt, die chondrozytäre Matrix wird zur Knochenmatrix verändert [38, 50] . Osteoklasten wandern über die Blutgefäße ein und höhlen die innere Region des Knochens für das Knochenmark aus. Antiangiogene und angiogene Faktoren helfen bei der Invadierung von Blutgefäßen. Hypertrophe Chondrozyten exprimieren *Vascular Endothelial Growth Factor* (*VEGF*), um die Invasion zu stimulieren. VEGF ist im hypertrophen Knorpelgewebe eingeschlossen und wird durch die Matrixmetalloproteinase 9 (*MMP-9*), in Osteoklasten produziert, freigesetzt [51] . MMP-9 aktiviert sehr effektiv *MMP-13*, die trotz geringer proteolytischer Aktivität den Abbau der hypertrophen Chondrozyten garantiert [52] .

*Runx2*, ein wichtiger Transkriptionsfaktor für die Knochenausbildung, wird von prä- und hypertrophen Chondrozyten exprimiert, wobei *VEGF* eines seiner Zielgene ist [49, 53] . Den

Knorpel umgebende Zellen differenzieren zu Osteoblasten, die mit der Formung der Knochenmatrix um den degradierten Knorpel beginnen [2, 38] .

Im weiteren Verlauf expandieren die Wachstumszentren oder -platten, ausgehend von den Enden der Knochen. Sekundäre Wachstumszentren findet man zwischen der Epiphysenfuge (Wachstumsfuge) und Metaphyse (distales Ende des früheren primären Wachstumszentrums). Sie bleiben bis zum Ende der Pubertät aktiv, wenn primäre und sekundäre Zentren verschmelzen. Der einzig verbleibende Knorpel der ersten Anlage befindet sich in und um Gelenke (s. Abb. 3).

Die Längenwachstumsrate eines langen Knochens entspricht der Produktionsrate neuer Zellen pro Säule multipliziert mit der durchschnittlichen Höhe einer hypertrophen Zelle. Die Knochen der Gliedmaßen wachsen 15 Jahre und stimmen mit einer Genauigkeit von 0,2% in ihrer Länge überein. Das beruht darauf, dass jede Zone zahlreiche kolumnare Chondrozyten enthält, so dass sich Wachstumsvariationen im Durchschnitt ausgleichen. Ein Knochen arretiert im Wachstum, wenn die Wachstumszonen verknöchern. Dieses passiert bei den unterschiedlichen Knochen zu verschiedenen Zeiten [1] .



**Abb. 3:** Schematischer Knochenaufbau

### 1.2.2 *PTH1H* / *IHH* und *FGF* / *BMP* Signaltransduktionen in der Chondrozytendifferenzierung

Eine Vielzahl von Signaltransduktoren und Transkriptionsfaktoren steuert die Chondrozytendifferenzierung und deren Genexpression. Die knorpelbildenden Chondrozyten differenzieren in vier unterschiedliche Stadien: ruhend, proliferierend, prähypertroph und hypertroph.

Zwei zentrale Signalmoleküle in der Steuerung von Chondrozytenproliferation und – differenzierung sind das von den prähypertrophen und einem Teil der hypertrophen Chondrozyten exprimierte *Indian hedgehog* (*IHH*) und das von periartikulären Chondrozyten

und perichondralen Zellen exprimierte *Parathyroid Hormone related Protein* (PTHrP), ein von *PTHLH* kodiertes sezerniertes Peptid, welches die hypertrophe Differenzierungsrate der proliferativen Chondrozyten negativ reguliert [7, 54] .

*PTHLH* besteht aus neun Exons und kann in vier unterschiedliche Spleißformen transkribiert werden, die zytoplasmatisch, nukleär und sezerniert vorliegen. *PTHLH* wird durch 2 TATA-Box Promotoren und einem GC-reichen Promotor (s. Abb. 25) reguliert. Sie werden gewebespezifisch und regulatorinduziert verwendet, aufgrund von ihnen findet auch alternatives *Splicing* statt [55, 56, 57, 58, 59] . Die Transfektion unterschiedlicher Zelllinien zeigte bisher eine dominierte Benutzung der proximalen TATA-Box [60] . Neben essentiellen Aufgaben von *PTHLH* in der enchondralen Ossifikation, steuert es epithelial-mesenchymale Interaktionen während der Zahn- und Brustdrüsenentwicklung, Laktationsprozesse (Kalziumtransfer) und ist auch für die maligne humorale Hyperkalzämie verantwortlich (OMIM: 168470).

Aus dem initialen Propeptid können drei sekretorische Formen durch endoproteolytische Spaltung synthetisiert werden (PTHrP: 1-36; 38-94; 107-139, auch Osteostatin genannt [61] ). Diese Proteine wirken auto-, para- und endokrin. PTHrP perzipiert sein Signal durch den PTH/PTHrP Rezeptor (PPR), der von proliferierenden und mit der Differenzierung beginnenden Chondrozyten exprimiert wird, und ist aufgrund eines Konzentrationsgradienten dafür verantwortlich, dass Chondrozyten im nichthypertrophen proliferativen Stadium bleiben und nicht zu hypertrophen Chondrozyten differenzieren [62, 63] . Die hypertrophen Chondrozyten werden fortwährend durch Knochen ersetzt. Proliferation und Differenzierung müssen einem genauen Kontrollmechanismus unterliegen, damit normales Wachstum gewährleistet ist. Veränderungen des Gleichgewichts von Proliferation und Differenzierung führen zu einer Störung des Wachstums und somit zu einer Verkürzung von Skelettelementen, bzw. zu reduzierter Knochenstabilität [38, 54, 64] .

*Indian Hedgehog* (*IHH*), ein weiteres Mitglied der *Hedgehog*-Familie reguliert indirekt über bisher unbekannte Mechanismen die Expression von PTHrP [65, 66, 67] . Es wirkt direkt und indirekt auf Chondrozytenproliferation und –differenzierung, signalisiert direkt an die undifferenzierten Chondrozyten und stimuliert die Chondrozytenproliferation umgekehrt entlang des *PTHLH* Konzentrationsgradienten [63] . Signale von *IHH* werden durch Bindung an den Rezeptor *Patched-1* (*PTCH1*), der das Membranprotein *Smoothed* (*SMO*) aktiviert, weitergeleitet. *IHH* Zielgene werden durch intrazelluläre Signalkaskaden ausgehend von aktivem *SMO* reguliert [68, 69] . *IHH* reguliert die PTHrP-Synthese, wodurch der Prozess der hypertrophen Chondrozytendifferenzierung verlangsamt wird [46, 54, 70] (s. Abb. 4).

Der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor *GLI3* gilt als *downstream* Regulator von *hedgehog*-Signalen [23, 24] . Es konnte gezeigt werden, dass die Differenzierung proliferierender in

hypertrophe Chondrozyten durch IHH / GLI3 abhängige PTHrP-Expression reguliert wird [71]

.

Die vollständige Differenzierung zu hypertrophen Chondrozyten führt zu einer verringerten IHH- und damit auch PTHrP-Expression. PTHrP ist ein Mediator von *IHH*, der durch Verzögerung der hypertrophen Differenzierung die Proliferation der Chondrozyten fördert und damit die Länge der proliferierenden Chondrozytenzone und folglich die Länge des Knochens bestimmt (s. Abb. 4). Fehlt *IHH*, differenzieren die Chondrozyten zu früh und es entsteht ein letaler Phänotyp mit extrem kurzen Extremitäten [46, 54, 70]. Die Entwicklung kolumnarer Chondrozyten wird über GLI3 unabhängig von der PTHrP-Expression reguliert [71]

Neben dem IHH/PTHrP-Signalweg ist der FGF- (*Fibroblast Growth Factor*-) Signalweg für die Chondrozytenproliferation und -differenzierung von besonderer Bedeutung. FGF sind Mitogene für Chondrozyten und Osteoblasten. Sie stimulieren die Knochenausbildung *in vivo* und *in vitro*. Zwei der vier unterschiedlichen FGF Rezeptoren (*FGFR*) *FGFR1* und *FGFR3* werden in der Wachstumsplatte exprimiert, wobei *FGFR1* in prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten, *FGFR3* in den proliferierenden Chondrozyten exprimiert wird. *FGFR3* fungiert als Regulator der Proliferation und Hypertrophie [72]. Die Aktivität der FGF/FGFR-Komplexe hängt von der gewebespezifischen Expression des Rezeptors, des Liganden, von Spleißvarianten und der Komposition der extrazellulären Matrix ab. Das Vorhandensein von Heparansulfaten in der extrazellulären Matrix ist Voraussetzung für intrazelluläre Signaltransduktion. FGF-Signale regulieren die Chondrozytenproliferation, *IHH*-Expression und die Rate der terminalen hypertrophen Differenzierung. Sie wirken als unabhängiger negativer Regulator der Chondrozytenproliferation und fördern die Differenzierung in terminale hypertrophe Chondrozyten (akzelerierte Differenzierung). Beide Effekte führen zu einer Verkleinerung der Zone der hypertrophen Chondrozyten [73]. FGF reduzieren die *IHH*-Expression, was zu einer akzelerierten Hypertrophie der Chondrozyten führt [38, 72, 74].

Gegenspieler der FGF sind die BMP, die die Hypertrophie inhibieren, die Proliferation über IHH aber positiv fördern [73, 74]. Sie sind die einzigen Mitglieder der TGF- $\beta$  Familie, die die ektopische Knochenausbildung induzieren und die Chondrozyten- und Osteoblastendifferenzierung verstärken können [3].

Wird dieses komplexe Zusammenspiel der verschiedenen Faktoren gestört, kommt es zum Ungleichgewicht zwischen Chondrozytenproliferation und -differenzierung und infolge dessen zu einer fehlgesteuerten enchondralen Ossifikation.

Die Abhängigkeit der beschriebenen Moleküle voneinander und deren Interaktion ist Gegenstand aktueller Forschung. Ergebnisse in Bezug auf das gestörte Gleichgewicht

zwischen Chondrozytenproliferation und –differentzierung, dessen Auswirkungen auf die humane Skeletogenese und die genaue Regulation der Morphogene PTHrP und IHH stehen bisher aus.

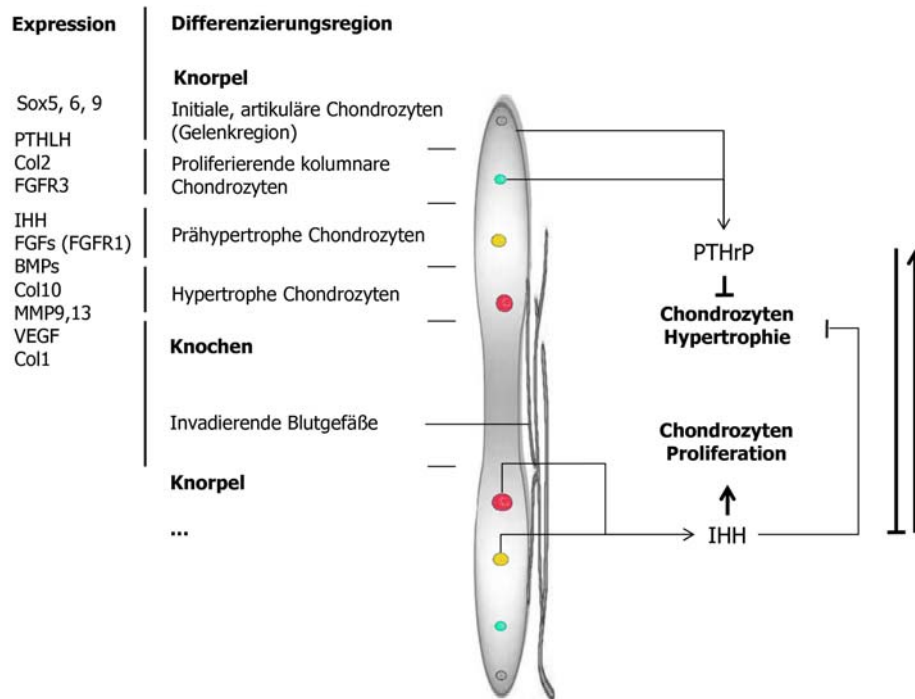


Abb. 4: Hauptregulatoren der enchondralen Ossifikation und ihre gewebespezifische Expression. IHH (Indian hedgehog), das die Chondrozytenproliferation positiv reguliert und negativ die von PTHrP (Parathyroid hormone related protein) initiierte Chondrozytenhypertrophie reguliert, sind Gegenspieler in einem physiologisch ausgeglichenen Signalsystem.

### 1.2.3 Postchondrogene Entwicklungsstadien

Alle Vertebraten Extremitäten bestehen aus einem proximalen Teil mit einem Element (Stylopod: Humerus oder Femur), einem mittleren Teil mit zwei Elementen (Zeugopod: Radius und Ulna oder Tibia und Fibula) und einem distalen Teil (Autopod: Carpalia oder Tarsalia) und einer variablen Anzahl von Phalangen (Fingern). Im Vertebraten verläuft die Skelettentwicklung der Extremitäten von proximal nach distal.

Nach der Extremitäteninitiation und der AER Induktion verlassen mesenchymale Zellen die Progresszone (PZ) und aggregieren in präknorpeligen Kondensationen. Einige Zellen um oder zwischen den Primordia der Skelettelemente begehen Apoptose, was zur Form der Extremitäten führt [75, 76]. Finger werden frei. BMP, vornehmlich 2, 4 und 7, werden in den Regionen zwischen den Fingern exprimiert und gelten als Induktoren der Apoptose (s. Abb.

5)[15] . Werden sie in den Fingern exprimiert, unterstützen sie beim Knorpelwachstum, werden sie inhibiert, kommt es zu Fingerfehlbildungen.

Rezeptor für apoptotische Signale im distalen Mesenchym ist der ubiquitär exprimierte BMP-Rezeptor *BMPR-1a*, *BMPR-1b* wird hingegen nur im Knorpel exprimiert [77, 78, 79] . *TGF- $\beta$ 2* gilt als endogener Induktor der Fingerbildung im Autopoden [80] . FGF antagonisieren BMP und *TGF- $\beta$ 2* und blockieren die BMP-induzierte Apoptose bzw. die *TGF- $\beta$ 2* induzierte Chondrogenese [81, 82] . Neben FGF ist *Noggin* ein Antagonist der BMP in den Regionen der späteren Finger (s. Abb. 5)[82] . Durch Bindung an BMP können sie mit ihren Rezeptoren nicht mehr interagieren [15, 83] .

*HOXA* und *HOXD* Komplexe sind für die Fingerentwicklung essentiell. Die Dosis von HOX Proteinen scheint für die Zahl und Größe der Finger verantwortlich zu sein [26, 84] . Cis-aktive Regulatoren spielen in der Genregulation eine große Rolle. Sie regulieren die *HOXD* Gene fingerspezifisch in der Entwicklung (Genregulation s. 1.5) [85, 86] .

Aktivine spezifizieren im Autopoden zusammen mit BMP die Position der Finger [87] . *Aktivin A* unterstützt die Chondrogenese der Finger, während *Aktivin B* nur bei der Ausbildung des letzten Fingergliedes exprimiert wird [87] . Aktivine gehören zur TGF- $\beta$ -Superfamilie und fungieren entweder als Homo- oder Heterodimere [88] . Die Chondrogenese durch Aktivine wird durch BMP vermittelt, reguliert von *BMPR1b* (s. Abb. 5) [87] .

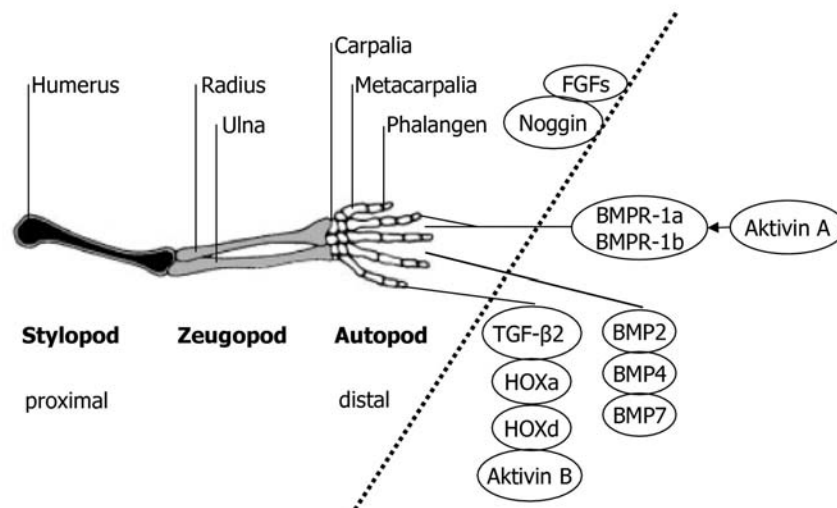


Abb. 5: Aufbau der oberen Vertebraten Extremität; Essentielle chondrogene Regulatoren der Fingerbildung.



### 1.3 Defekte während der enchondralen Ossifikation

Störungen des Wachstums können prinzipiell durch Störungen der Proliferation und Differenzierung von Chondrozyten, sowie durch Störungen der Komponenten der extrazellulären Matrix verursacht werden.

Skeletale Anomalien werden untergliedert in Dysostosen, wobei einzelne oder Gruppen von Knochen deformiert sind und Osteochondrodysplasien, bei denen Störungen während der Entwicklung von chondro-ossifikalen Geweben auftreten [4, 89, 90, 91, 92] . Als Dysostoplasien bezeichnet man den Verlust oder die Unterentwicklung einzelner Knochen im Zusammenhang mit einem Wachstumsdefekt aufgrund von genetischen Defekten, die entweder eine Störung der mesenchymalen Kondensation und / oder Differenzierung verursachen. Aspekte der Dysostose und Dysplasie fallen in die Klassifikation der Brachydaktylien. Die Ursachen einer Reihe von Chondrodysplasien wurden bereits aufgeklärt [4, 93, 94, 95, 96] .

#### 1.3.1 Radiologische Merkmale der Brachydaktylien A-E

Brachydaktylien (BD) sind Fehlbildungen der Hände und Füße, die durch verkürzte Phalangen und/oder Metakarpalia bzw. Metatarsalia charakterisiert sind. Sie werden entsprechend der Bell-Klassifikation [97] in fünf Gruppen (A-E) eingeteilt und meist autosomal-dominant vererbt. Mindestens fünf Subtypen werden bei der Brachydaktylie A und drei bei der Brachydaktylie E unterschieden. BDA ist durch Verkürzung der Mesophalangen gekennzeichnet. Die Verkürzung betrifft bei BDA1 alle Mesophalangen, bei BDA2 insbesondere die Mesophalangen II, bei BDA3 ausschließlich die Mesophalangen V, bei BDA4 die Mesophalangen II und V, bei BDA5 fehlen sämtliche Mesophalangen, die Nägel sind hypoplastisch und die Daumenendglieder dupliziert. BDB ist durch eine Verkürzung vor allem der distalen Phalangen charakterisiert; der Phänotyp reicht von Hypoplasien unterschiedlicher Grade bis zur Aplasie. Nagelveränderungen sowie Malformationen von Daumen und Großzehen sind assoziiert mit betroffenen Mesophalangen. BDC betrifft insbesondere die Basis- und Mesophalangen und Metakarpalia der Strahlen I, II und III; der vierte Strahl ist deshalb der Längste. Bei BDD sind nur die distalen Phalangen der Daumen und / oder der Großzehen verkürzt und verbreitert. BDE ist gekennzeichnet durch eine Verkürzung der Metakarpalia und Metatarsalia. Bei BDE1 ist die Verkürzung auf die Metakarpalia bzw. -tarsalia IV beschränkt [98] . Bei BDE2 sind Verkürzungen von Metakarpalia bzw. -tarsalia variabel kombiniert mit Hypoplasien der distalen Phalangen I und

III sowie der Mesophalangen II und V [99] . BDE3 betrifft verschiedene Metakarpalia ohne Phalangenbeteiligung.

Bei den o. g. Brachydaktylien stehen die Fehlbildungen der Hände und Füße, neben aufzufindenden Zapfenepiphysen, im Vordergrund. Dennoch ist die Symptomatik auch bei den so genannten isolierten Brachydaktylien z. T. nicht auf die Hände und Füße beschränkt: Kleinwuchs kommt im Zusammenhang mit BDA1 und BDE vor, eine geistige Retardierung insbesondere in Verbindung mit BDA1.

Darüber hinaus kann Brachydaktylie ein Symptom komplexer Syndrome sein, die sowohl autosomal dominant (Bilginturan-Syndrom: BDE), autosomal-rezessiv (Robinow-Syndrom: BDB (OMIM 268310, Grebe-Syndrom: BDC (OMIM 200700) oder X-chomosomal (Turner-Syndrom: BDE) erblich sein können [93] .

### 1.3.2 Molekulare Ursachen bei monogenen Brachydaktylie – Formen

Einige Loci mit kodierenden Gensequenzen, die bei Mutationen zu Brachydaktylien führen, konnten kartiert werden [12, 93] . Fehlende oder modifizierte Genprodukte, die mit Extremitätenanomalien assoziiert sind, wurden von Daluiski et al. aufgelistet [100] .

BDA1 (OMIM 112500) wird durch Mutationen im Gen *IHH*, Genlocus 2q35 verursacht [101] , BDA2 (OMIM 112600) durch Mutationen im *BMPR-1B*, Genlocus 4q23 oder im Gen dessen Liganden, *Growth differentiation factor 5 (GDF5)*, Genlocus 20q11.2 [102, 103] . Phänotypisch ähnlich der BDA1 ist eine Brachydaktylie der Maus, hervorgerufen durch Dysregulation von *SHH* durch eine Inversion [104] . BDB (OMIM 113000) kann durch Mutationen in *Receptor Tyrosine Kinase-like Orphan Receptor 2 (ROR2)*, Genlocus 9q22, hervorgerufen werden [105, 106, 107] . BDC (OMIM 113100) ist wie BDA1 bedingt durch Mutationen in *GDF5* [50, 108] und wird zusätzlich auch auf den Locus 12q24 kartiert [109] . Punktmutationen in *Homeobox protein D13 (HOXD13)*, Genlocus 2q31, wurden bei BDD (OMIM 113200) und BDE identifiziert [110] . Eine Verlängerung des N-terminalen Polyalanin-Repeats in Exon 1 resultiert dagegen in einer Polysyndaktylie [110, 111, 112] .

BDE im Zusammenhang mit Deletionen/Mikrodeletionen in 2q37 geht mit Kleinwuchs, geistiger Behinderung und Adipositas einher [113, 114] . BDE in Kombination mit Kleinwuchs und Hypertonie (Bilginturan-Syndrom; OMIM 112410) konnte auf den p-Arm des Chromosoms 12 (12p12.2-p11.2) kartiert werden. Verantwortlich ist ein komplexes genomisches Rearrangement, das mehrere Gene betrifft [115, 116, 117] .

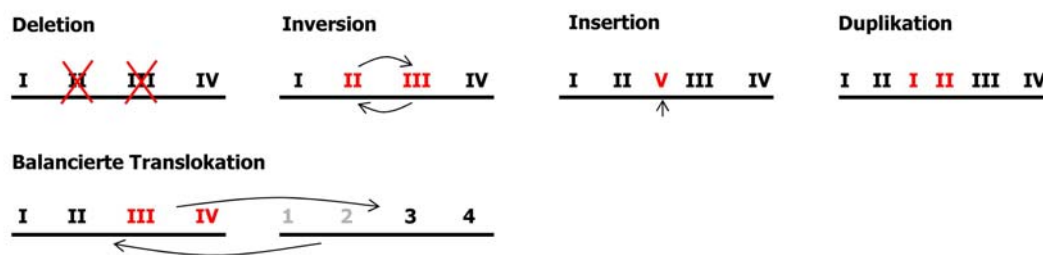
Weitere syndromale Erkrankungen mit BDE sind bekannt: Die Albright-Osteohypertrophie (AHO; OMIM 174800) ist charakterisiert durch Kleinwuchs, rundes Gesicht, Adipositas, mentaler Behinderung und Verkalkungen. Die AHO1 (OMIM 103580) geht mit

Parathyroidhormon- (*PTH*) und Multihormonresistenz durch Verminderung der Aktivität des die Adenylatzyklase stimulierenden G-Proteins (*Gs-alpha*) infolge *GNAS1*-Mutationen (Genort 20q13.2) einher [118, 119, 120] . Bei der Ausprägung der Symptomatik, einschließlich der skelettalen Veränderungen, spielen Imprinting-Effekte eine Rolle [121] . Ein identischer Phänotyp (AHO2) wird im Zusammenhang mit proximaler Deletion 15q, del(15)(q11q13) beschrieben [122] . AHO3 bezeichnet das Mikrodeletionssyndrom in 2q37 (s.o.). Beim Ulrich-Turner-Syndrom (Monosomie X), durch Kleinwuchs und Hypogonadismus charakterisiert, ist Metakarpal V in 65% der Patientinnen verkürzt. Weitere komplexe Syndrome mit Verkürzung von Metakarpala/-tarsalia sind bekannt, wie z.B. das Pallister-Hall-Syndrom (OMIM 146510), verursacht durch Mutationen im *GLI3*-Gen auf 7p13 [123] .

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der morphogene Faktor PTHrP in der Lage ist, die Chondrozytenproliferation über *GLI3* zu steuern, und zwar auf einem Weg, der von IHH unabhängig ist [124] . Dies könnte bedeuten, dass mutiertes oder fehlexprimiertes PTHrP – unabhängig von *GLI3* - an der Pathogenese einer BDE beteiligt ist. Dieses Modell korreliert auch mit dem Ergebnis, dass der PTHrP-Rezeptor (*PTH1R*) G-Protein gekoppelt ist und Mutationen in der *Gs-alpha*-Untereinheit des G-Proteins (kodiert von *GNAS1*) zur Albright-Osteohypertrophie führen, welche mit einer BDE einhergeht (s.o.). Es scheint daher einen möglichen Zusammenhang zwischen der PTHrP-Signaltransduktion und der Pathogenese der BDE zu geben. Bisher ist allerdings kein Fall publiziert worden, bei dem aberrantes oder aberrant exprimiertes PTHrP ursächlich für eine BDE verantwortlich ist. Die Überexpression von Pthrp im transgenen Mausmodell resultiert in einer Chondrodysplasie, charakterisiert durch verspätete enchondrale Ossifikation und verkürzten Extremitäten bzw. kleinerer Statur [125] , wobei Pthrp null Mäuse phänotypisch nahezu identisch sind [126, 127] .

## 1.4 Chromosomenanomalien

Chromosomenanomalien werden in numerische und strukturelle Aberrationen unterschieden. Bei numerischen Anomalien treten keine Chromosomenbrüche auf, genannt seien Polyploidien, Aneuploidien und Mixoploidien. Durch Chromosomenbrüche entsteht eine Deletion, wenn das genomische Fragment zwischen zwei Bruchpunkten nicht wieder verknüpft wird. Eine Inversion ist die Folge, wenn der Abschnitt invertiert und Reparaturenzyme die DNA religieren. Wird das Fragment vor Religation amplifiziert, spricht man entweder von einer Duplikation oder Amplifikation. Eine Insertion resultiert aus drei Bruchpunkten, die herausgeschnittene genomische Region wird an einer anderen Stelle desselben oder eines anderen Chromosoms eingefügt. Translozieren chromosomale Fragmente zwischen nichthomologen Chromosomen wird dies als Translokation bezeichnet (s. Abb. 6). Die Erkennung und Religation von DNA Enden nach einem Chromosomenbruch wird aktiv von katalytisch arbeitenden Enzymen durchgeführt (*Nonhomologous End Joining Pathway* (NHEJ)) [128] .



**Abb. 6:** Chromosomenaberrationen

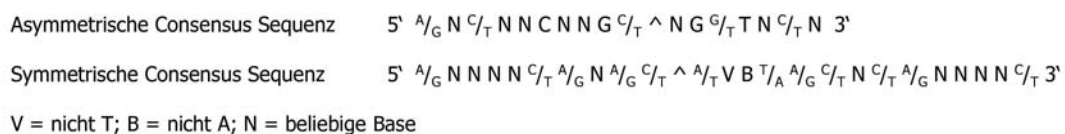
Ursache für genomische Anomalien sind genetische Rekombinationen oder Störungen während der Embryonalentwicklung bei den Furchungsteilungen, anomale Reifeteilungen während der Oogenese bzw. Spermatogenese, Defekte in der Meiose durch fehlende Trennung der Chromatiden (*nondisjunction*) oder durch verzögerte Migration eines Chromosoms nach der Mitose in einen der beiden neuen Tochterkerne (z.B. Monosomie), nichthomologe Rekombination bei *crossing overs*, sowie Mutagene [129, 130] .

### 1.4.1 Molekulare Pathogenese der Translokation

Die molekulare Charakterisierung apparenter klinischer Phänotypen erklärte ursächlich die Prozesse bei einer Translokation. Topoisomerase II (*TOPII*) und Translin (*TSM*)

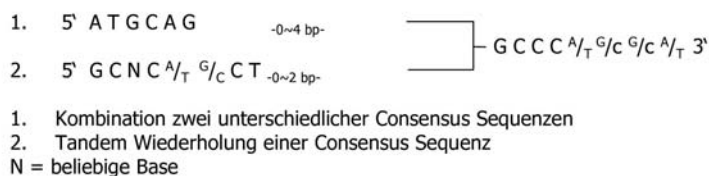
spielen als Enzyme bei Chromosomenbrüchen eine Rolle. Sie sind bei der Replikation, Rekombination und DNA Reparatur als hochkonservierte Enzyme involviert. Die Topoisomerase II ist verantwortlich für die Chromosomensegregation und die Aufrechterhaltung der Chromosomenstruktur während der Meiose I, wo sie vorzugsweise DNA *crossover* Punkte anhand einer asymmetrischen und symmetrischen *Consensus* Sequenz erkennt (s. Abb. 7). Die Prädiktion der Konsensussequenzen basiert auf *in vitro* Experimenten [131, 132, 133, 134]. Die Topoisomerase relaxiert *supercoiled* DNA durch transiente Restriktion und Religation beider DNA Stränge der Doppelhelix. In Präsenz von ATP kann eine zweite Helix durch die geschnittenen DNA Stränge passagiert werden. Es folgt die Religation [135].

Experimentell wurde bestätigt, dass das Vorhandensein eines Guanins an Position 2 des Topoisomerase II Motives nach dem putativen Restriktionsort, bzw. eines Thymins an Position 4 zu einem DNA Doppelstrangbruch führt. Andere Basen dieser Positionen führen zu einem Einzelstrangbruch [136].



**Abb. 7:** Asymmetrisches und symmetrisches Bindungsmotiv der Topoisomerase II

Translin bindet über seine Konsensussequenz ssRNA und ssDNA und kann durch die aktive Heterodimerbildung mit dem Protein Trax auch dsDNA Sequenzen binden (s. Abb. 8). Translin ist bei chromosomalen Translokationen und bei der Genregulation von Hirn und Testis involviert. [137, 138].



**Abb. 8:** Erkennungssequenzen von Translin

Translin erkennt DNA Einzel- oder Doppelstrangbrüche entweder als glatte oder überhängende Enden im ersten Schritt der DNA Reparatur, bindet 3' oder 5' des

Bruchpunkts, meist in unmittelbarer Nähe eines Topoisomerase II Motives. Translin ist mitverantwortlich für die DNA Reparatur, translationale Regulation und meiotische Rekombination [139, 140, 141, 142, 143] .

Bisher wurde die Anwesenheit von Topoisomerase II und Translinmotiven an Translokationsbruchpunkten von Synovial-, Ewing- , Rhabdomyo-, Liposarkomen, Lymphomen und Leukämien bestätigt [143, 144, 145, 146, 147] . Mikrodeletionen, -duplikationen oder -insertionen von einigen Basen konnten durch Sequenzierung an chromosomalen Bruchpunkten gefunden werden.

Bisher geht man davon aus, dass eine oder mehrere Nukleasen die Bruchpunkte generieren, möglicherweise Topoisomerase II dies vollzieht, ssDNA Enden entweder deletiert oder durch DNA Synthese zur erfolgreichen Ligation aufgefüllt werden, wodurch es zu Mikromutationen kommt [146, 148, 149, 150] .

Bei Anwesenheit eines weiteren Doppelstrangbruchs, dessen DNA Enden durch Translin / Trax erkannt werden, kann durch die ligierende Eigenschaft der Topoisomerase eine illegitime Rekombination vermittelt werden und eine Translokation die Folge sein.

## 1.5 Genregulation

### 1.5.1 Die Bedeutung konservierter cis-regulatorischer Elemente (CRE)

Die Genexpression kann durch die unterschiedlichen Steuerungsmechanismen der epigenetischen, transkriptionellen und posttranskriptionellen Modifikation kontrolliert werden (s. Abb. 9). Das Zusammenwirken der Mechanismen in Interaktion mit Koaktivatoren und Mediatoren garantiert eine entwicklungs- und gewebespezifische Feinregulation. Auf posttranskriptionelle Modifikationen wie alternatives Spleißen der Transkripte, RNA – *editing*, sowie microRNA und posttranslationale Regulation sei hier nur verwiesen (s. Abb. 9).

Epigenetische Modifikationen, die u.a. auch geschlechtsspezifisch vererbt werden, können neben reversiblen Veränderungen auch irreversible konstante Regulationszustände herstellen. Methylierte Allele werden bereits in den ersten Stadien der Embryogenese festgelegt. Es kommt somit nur zur Ausprägung des paternalen oder maternalen Allels (*imprinting, gene silencing, X - inactivation*) [130]. Weitere reversible Histonmodifikationen, die die Genregulation betreffen, werden unter Punkt 1.5.2 besprochen.

Der Promotorbereich eines Gens ist für die basale Transkription zuständig. Kernbereiche eines Promotors sind die TATA-Box mit der Konsensussequenz  $TATA^A/T^A/T$  [151] und das IIB *recognition element* (*BRE*) mit der Konsensussequenz  $G_c^G/G_c^G/A CGCC$ , an das der generelle Transkriptionsfaktor TFIIB bindet [152, 153]. Nach Bildung des Transkriptionsinitiationskomplexes aus allgemeinen Transkriptionsfaktoren und dem TATA-Box-Bindungsprotein (*TBP*) kann spezifische Transkription ausgehend von der Transkriptionsstartstelle (TSS) durch die RNA Polymerase II erfolgen [154, 155].

Proximale Promotorelemente grenzen an den Promotorkernbereich und regulieren positiv oder negativ die Genexpression. GC-reiche Elemente mit umgebenden *Specificity Protein 1* (*SP1*) Transkriptionsfaktorbindungsstellen (TFBS) [156] und die CCAAT-Box gehören hierzu [157].

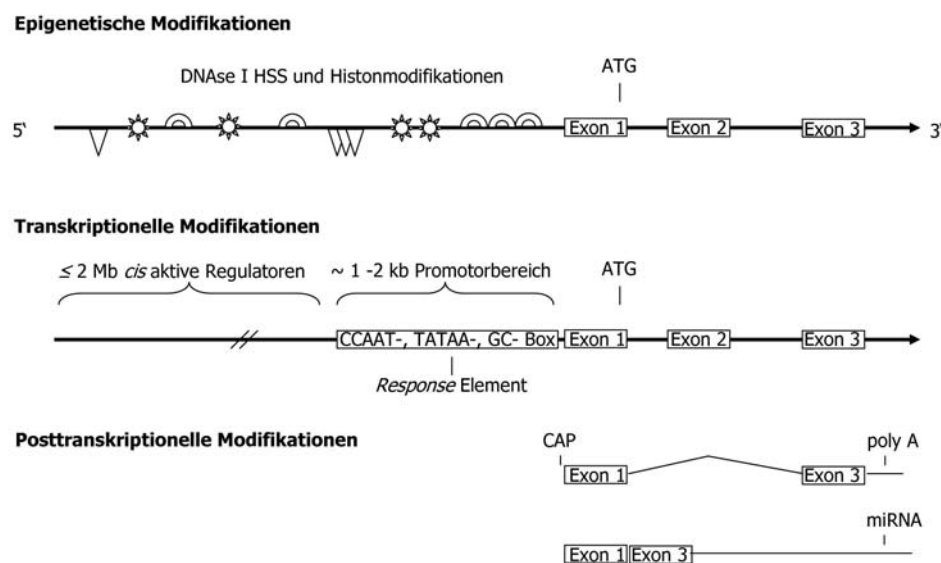
Es war lange unklar, wie groß die genomische Distanz zwischen Promotor und cis-regulatorischen Elementen (CRE) ist. Bioinformatische Berechnungen zeigen, dass 95% duplizierte CRE mit duplizierten Genen assoziiert sind und vorhergesagte Zielgene bei Mensch und Kugelfisch innerhalb von 250 kb bis 1,25 Mb strangauf- oder strangabwärts putativ regulieren [158, 159]. Außerdem war die essentielle Bedeutung von konservierten CRE nicht bekannt.

Es konnte gezeigt werden, dass entwicklungs-genetisch wichtige Gene in Würmern, Fliegen und Vertebraten CRE aufweisen und evolutionär konservierter sind, als orthologe protein-kodierende Sequenzen unterschiedlicher Spezies [160]. Im Gegensatz dazu ist die

gewebespezifische Genregulation unterschiedlicher Spezies sehr differierend. Konservierte Transkriptionsfaktoren binden zwischen 41-89% speziesspezifisch, betrachtet man die Bindung eines Transkriptionsfaktors an orthologen Promotoren zweier Spezies, stimmt nur ein Drittel der Bindungsstellen überein [161] .

Die Genregulation über große genomische Distanzen von mehreren hundert Kilobasen durch CRE wurde bisher durch zwei molekulare Mechanismen beschrieben. Transkriptionsaktivatoren binden an strangaufwärts gelegenen regulatorischen Sequenzen und rekrutieren chromatinmodifizierende Proteine an den jeweiligen Promotor. Hier wird entweder ATP-abhängig hydrolytisch über Proteine der SWI/SNF-Superfamilie [162] oder über histonmodifizierende Proteine (Histonacetyltransferasen, -methyltransferasen etc.) das Nukleosom bzw. die Genexpression positiv oder negativ verändert [163, 164] (weiteres s. 1.5.2). Positiv regulierende CRE werden als *Enhancer*, negative als *Silencer* bezeichnet.

Neben charakteristischen Histonmodifikationen der Chromatinstruktur sind aktive Chromatinbereiche durch DNase I *Hypersensitive Sites* (DNase I HSS) gekennzeichnet [164, 165, 166] .



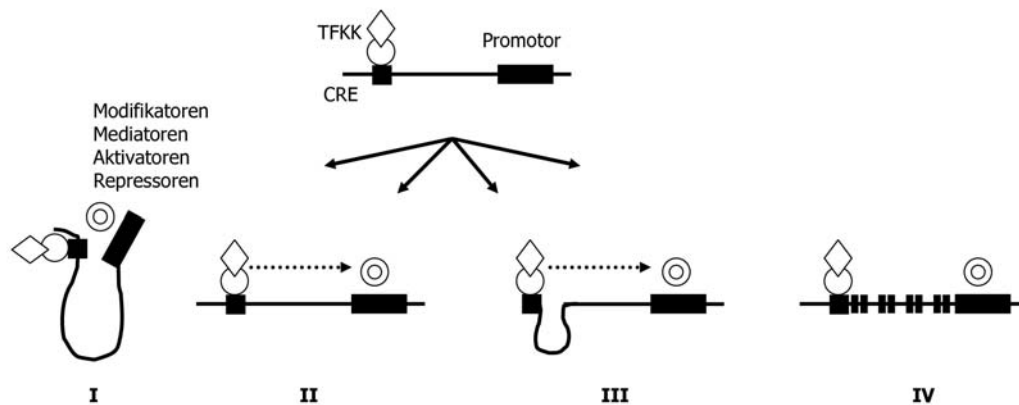
**Abb. 9:** Genetische, die Genregulation beeinflussende Modifikationen.

Vier Modelle zur räumlichen Darstellung zwischen CRE und Promotor werden kontrovers diskutiert. I, die Bindung des Transkriptionsfaktor – Koaktivator – Komplexes (TFKK) an eine cis-gelegene Sequenz mit hoher Interspezieshomologie löst die Chromatinschleifenbildung aus, es kommt zum Kontakt zwischen Regulator und Promotor [166, 167, 168, 169, 170] .



Gering verstanden ist der Mechanismus der Schleifenbildung, möglicherweise kommt es aufgrund der flexiblen DNA Konsistenz zum TFKK – Promotorkontakt [171] .

II, der TFKK scannt das Chromatin nach dem verwandten Promotor. III, die regulatorische Sequenz mit TFKK sucht das Chromatin ab, Hypothese I und II werden hier gekoppelt [172] . IV, Mediatoren binden zwischen CRE und verwandtem Promotor, wodurch diese in aktiven Zustand und Nähe versetzt werden [173] (s. Abb. 10).



**Abb. 10:** Räumliche Modelle (I-IV) zur cis-Regulation von Genen

Insulatoren sind weitere Partner im Zusammenspiel zwischen CRE und Promotoren. Sie funktionieren entweder als Barriere, um unterschiedliche Chromatinregionen voneinander zu trennen, oder als Regulatorblocker, um die vorhergesehene Kommunikation zwischen einem Regulator und dem verwandten Promotor zu gewährleisten [174, 175, 176, 177] . Der transkriptionelle Repressor *CCCTC-binding factor* (*CTCF*) flankiert den murinen und humanen  $\beta$ -Globin Locus [178] , Bindungsmotive an Insulatoren wurden in unterschiedlichen Kontexten bestätigt [179, 180, 181] .

Kleinjan *et al.* listet in einem *Review*-Artikel chromosomale Rearrangements auf, die durch Positionseffekte aufgrund von genomischen Bruchpunkten zu aberranter Genexpression und apparenten humanen Krankheiten führen [182] . Die Kommunikation zwischen Regulatoren und Promotoren wird durch Mutationen, physikalische Dissoziation oder Modifikation der Chromatinstruktur verändert.

Der experimentelle Nachweis von CRE ist kompliziert. Im ersten Schritt wird bioinformatisch die Konservierung genomischer Sequenz zwischen unterschiedlichen Spezies, vornehmlich unter den Mammalia, von mindestens 70%, die zur Identifikation eines regulatorischen Elements beiträgt, bestimmt [183] . Funktionelle Analysen durch Reporterassays stellen den Link zwischen spezifischem Promotor und Regulator her. Eine gemeine regulatorische Sequenz von *Interleukin 4, 5* und *13*, sowie intragene gewebespezifische *GLI3 Enhancer* und

*MECP2* Regulatoren wurden bisher charakterisiert [184, 185, 186] . Die Eliminierung eines *SHH* Regulators führt zur aberranten *SHH* Expression und verkürzten Extremitäten, während der murinen Gliedmaßenentwicklung. Die Entfernung zu *SHH* beträgt ca. 1 Mb [187, 188] . In einer Familie mit Campomelischer Dysplasie, einer Skelettfehlbildung, konnte ein translozierendes Rekombinationsereignis zwischen Chromosom 4 und 17 mit Bruchpunkten strangauf- und strangabwärts von *SOX9*, einem wichtigen Regulator der Chondrogenese und enchondralen Ossifikation charakterisiert werden. Evolutionär konservierte cis-aktive Regulatoren wurden translokationsbedingt physikalisch dissoziiert – die verwandte Genregulation erfolgte embryogenetisch aberrant [189] .

### 1.5.2 Histonmodifikationen

Epigenetische Mechanismen erweitern den Informationsgehalt des genetischen Kodes um ein Vielfaches, da sie sowohl reversibel, als auch irreversibel sind.

Der gepackte Zustand von DNA im Nukleus wird Chromatin genannt. Die Kernhistone H2A und H2B als Dimer, wie auch H3 und H4 als Dimer bilden zusammen als Oktamer das Nukleosom, eine gepackte Organisationseinheit des Chromatins, um die 147 bp in 1,75 Windungen dsDNA gewickelt sind. Das fünfte Histon H1 komprimiert die um Faktor 7 komprimierte DNA auf Faktor 40-50 zu einer Nukleosomen-Helix. Der komprimierteste Chromatinzustand wird bei Metaphasechromosomen erreicht [130] .

Es liegen überwiegend positiv geladene basische Aminosäuren vor, die elektrostatisch negative DNA anziehen. Die biologische Bedeutung von Histonmodifikationen schließt neben fundamentalen DNA Organisationszuständen, deren Veränderung bei Transkription, Replikation oder Reparatur, genregulatorische Funktionen und auch epigenetische Muster und deren Vererbung ein (*imprinting*) [190] . Durch Massenspektrometrie und spezifische Antikörper wurden mehr als 60 Histonmodifikationen der Aminosäuren an N-terminalen Enden der sogenannten *histone tails* detektiert.

Aktivierende Histonmodifikationen sind Acetylierung, Lysin-Methylierung, Phosphorylierung, und Ubiquitinylierung, inaktivierende Sumoylierung, Deiminierung und Prolin Isomerisierung, die sehr spezifisch durch Histon- Methyltransferasen, -Demethylasen, -Acetyltransferasen (HATs), -Deacetylase (HDACs), Kinasen, Ubiquitilase und Isomerasen ausgeführt werden. Grundsätzlich wird zwischen Aktivierung und Repression unterschieden, wobei es Ausnahmen gibt. HDACs spielen entgegen früherer Erkenntnisse auch eine Rolle bei der transkriptionellen Aktivierung [191] . Die Acetylierung von H3Lys9 (H3K9) ist mit aktivem Chromatin assoziiert, während Methylierung in Heterochromatin resultiert [192] .

Die Änderung der Chromatinarchitektur resultiert in Genomdomänen, wobei Euchromatin transkriptionell aktive, Heterochromatin transkriptionell inaktive Bereiche eingrenzt, Chromosomenenden schützt oder die Chromosomenseparation während der Mitose garantiert [190]. Die Addition einer Acetylgruppe durch HAT an Lysine der N-terminalen Enden der *histone tails* neutralisiert die positive Ladung der Lysin-Seitenkette. Die Affinität zu DNA wird geringer, wodurch Promotoraktivierungen und Nukleosomenrepositionierungen denkbar sind [193, 194]. Eine weitere Erklärung für die epigenetische Kontrolle bei der Genregulation ist die Neubildung von Proteinbindungsmotiven bei Acetylgruppentransfer. Durch Lysin-Acetylierung entstehen Motive für Bromodomäne beinhaltende Transkriptions- und Chromatinregulatoren [195]. Außerdem wurde der transkriptionelle Koaktivatorkomplex p300 / CBP als HAT identifiziert [196].

Bisher sind H3 und H4 grundsätzlich in Promotorregionen oder an Transkriptionsstartstellen (TSS) von aktiv transkribierten Genen acetyliert, H3K4 trimethyliert [197]. Introns, oder kodierende Bereiche sind dagegen schwach acetyliert. Man geht davon aus, dass dadurch promotorähnliche Sequenzen reprimiert werden [198, 199]. Hingegen ist monomethyliertes H3K4 meist eine Modifikation eines cis-aktiven *Enhancers*, wohingegen H3K9, H3K27 und H4K20 stark methyliert und schwach acetyliert sind und somit reprimierende *Silencer* bzw. Heterochromatin aufzeigen [190, 192, 197, 200, 201, 202].

Möglicherweise basiert die Steuerung der Modifikationen auf einem sequentiellen oder kombinatorischen Histon-Code, der einerseits von bestimmten Histonmodifikationen abhängig ist, die weitere Modifikationen bedingen, oder andererseits von sekundär bindenden Proteinen [192, 203, 204, 205]. Desweiteren spielen die spezifischen Promotoren, Entwicklungsstadien, die DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren und gewebespezifische Genexpression eine Rolle in der jeweiligen Histonmodifikation [200, 206].

## 1.6 Grundlage des Projektes

### Autosomal-dominante Translokation t(8;12)(q13;p11.2)

Die Familie mit Translokation t(8;12) wurde durch das Institut für Medizinische Genetik Chemnitz (Herr Dr. A Kobelt, 1995) und das Institut für Medizinische Genetik der Charité Berlin (Frau PD Dr. S. Tinschert, 1998) rekrutiert. Eine erneute Untersuchung erfolgte 2006 im Institut für Klinische Genetik in Dresden. Die Indexpatientin (IV:2) wurde 1995 während ihrer ersten Schwangerschaft in der Humangenetik vorstellig. Eine Brachydaktylie Typ E (BDE; OMIM 113300) wurde bei ihr, ihrem Vater und dem 1996 geborenen Sohn (V:1) der Indexpatientin anhand radiologischen Befundes diagnostiziert (s. Abb. 11 A, C). Anamnestisch wurde eine Brachydaktylie beim Großvater väterlicherseits berichtet. Eine klare Zuordnung zu einer der bekannten BDE-Unterformen gelingt nicht, da außer der im Vordergrund stehenden Brachymetakarpie/-tarsie, die am stärksten den vierten Strahl betrifft, auch Tele-, Meso- und Basophalangen verkürzt sind, sowie Zapfenepiphysen diagnostizierbar sind (s. Tab. 2, Abb. 11C). Zytogenetisch wurde mittels hochauflösender Chromosomenanalyse (*G-Banding*) eine balancierte Translokation t(8;12)(q13;p11.2) bei der Indexpatientin (IV:2), deren Vater (III:2) und Sohn (V:1) nachgewiesen. Die Translokation fand sich nicht beim Onkel (III:1) der Indexpatientin und dessen Sohn (IV:1). Außer einer BDE haben die Translokationsträger eine kraniofaziale Gestalt, die charakterisiert ist durch Makrozephalie, prominente Stirn und eingesunkene Nasenwurzel (s. Abb. 11B). Es liegt kein Kleinwuchs vor (Körperlängen im unteren Normbereich bis oberhalb der Norm), allerdings ist eine relative Verkürzung der Extremitäten im Vergleich zum Stamm auffällig (s. Tab. 1). Der Blutdruck liegt im Normbereich, geistige Retardierung liegt nicht vor.

#### 1.6.1 Tab. 1: Klinische Merkmale der Familie mit Translokation t(8;12)

Patient	Körperlänge (KL)	Verhältnis Armspanne : KL	Kopfumfang
III:2	178,0cm (10.-25. Perz.)	0,95	58cm (98. Perz.)
IV:1	163,8cm (10.-25. Perz.)	0,88	57cm (97. Perz.)
V:1	162,7cm (> 97. Perz.)	0,92	58,5cm (>98. Perz.)

**1.6.2 Tab. 2: Radiologische Merkmale der Familie mit Translokation t(8;12)**

	<b>Hände: Verkürzung</b>		<b>Füße: Verkürzung</b>	
Patient	<b>III:1</b>	<b>IV:2</b>	<b>III:1</b>	<b>IV:2</b>
Telephalangen		bds. I, II; III, V		I
Mesophalangen		V	bds. II, III, IV	II, III, IV, V
Basophalangen		re: V li: V (I)	bds. III, IV	II, III, IV, V
Metakarpalia/- tarsalia	bds. IV; (III, V)	re: III, IV, V li: I, II, IV, V	bds. IV (li>re)	III, IV

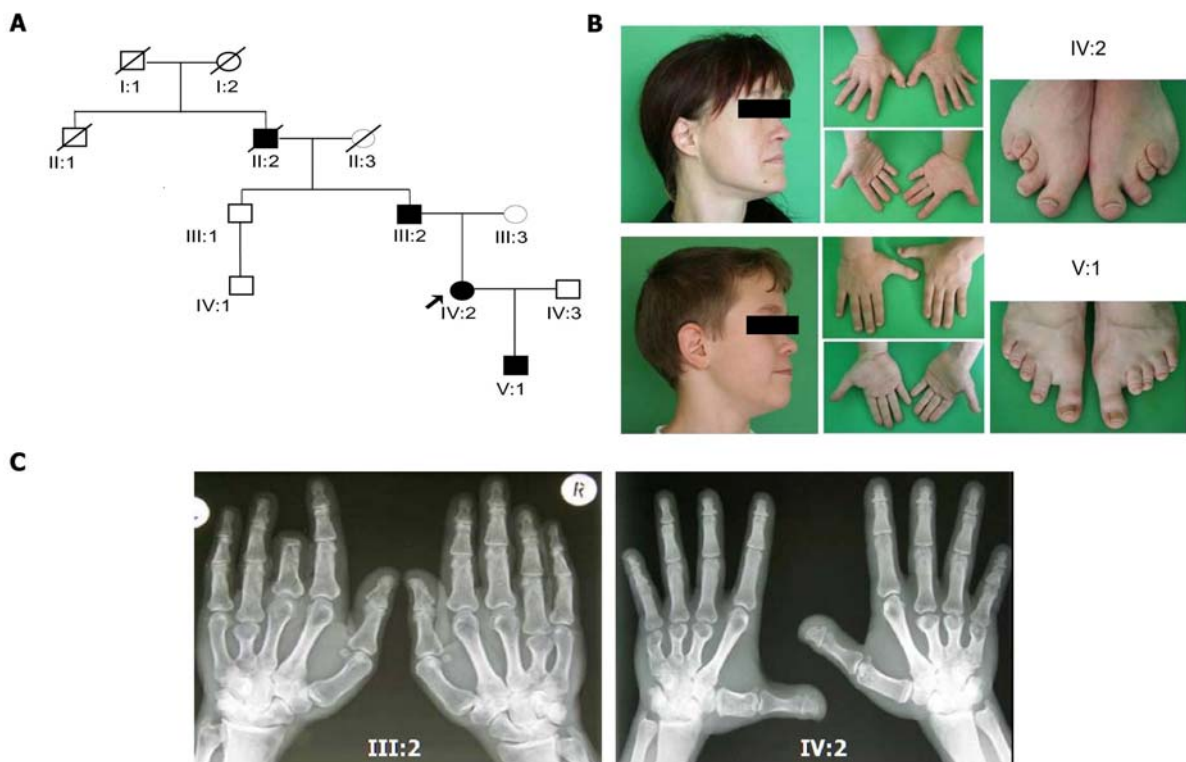


Abb. 11: A: Stammbaum der Familie mit t(8;12), durchgestrichene Individuen sind bereits verstorben; Pfeil markiert die Indexpatientin; B: Phänotypisierende Diagnose der Humangenetik; C: Radiologische Befunde der Hände der Patienten III:2 und IV:2 mit deutlich erkennbarer Brachydaktylie Typ E

## 1.7 Ziele

Die Identifizierung der Ätiologie der familiären Brachydaktylie Typ E, ihre molekulare und pathogenetische Charakterisierung sind die Hauptziele des Projekts. Die hier zu charakterisierende Brachydaktylie Typ E geht mit einem Translokationsereignis zwischen dem kurzen Arm des Chromosoms 12 (12p) mit dem langen Arm von Chromosom 8 (8q) einher. Der Translokationsbruchpunkt auf 12p liegt strangaufwärts von *PTH LH* (*Parathyroid hormone like hormone*), einem essentiellen Gen der Chondrogenese. Hypothetisch ist von einer *PTH LH* Dysregulation, aufgrund translokationsbedingter physikalischer Trennung, oder der Generierung von neuen cis-aktiven Regulatoren auszugehen.

Neben der Notwendigkeit einer Identifikation der Translokationsbruchpunkte auf 12p und 8q sollen etwaige Sequenzanomalien aufgezeigt und putative cis-aktive *PTH LH* Regulatoren bioinformatisch vorhergesagt werden. Ihre Funktion soll *in vitro* in Chondrozytenzelllinien durch Reporterassays untersucht werden, um den Zusammenhang zur *PTH LH* Expression und der Skelettentwicklung herstellen zu können.

Die Identifizierung regulatorischer, nichtkodierender Sequenzen und ihre genregulatorische Assoziation geben Aufschluss über komplexe intrachromosomale Aktivitäten. Die Aufklärung monogenetischer Defekte mit assoziierten Fehlbildungen ist ein geeignetes Instrument, sowohl Erkenntnisse zum Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen der Embryonalentwicklung zu gewinnen, als auch pathogenetische Wirkmechanismen aufzuklären, die, bedingt durch die Dysregulation des identifizierten *PTH LH* Gens zu einer gestörten Chondro- bzw. Skeletogenese führen und letztendlich Skelettanomalien bedingen. Untersuchungen dieser Funktionsstörungen geben Aufschluß über grundlegende Mechanismen der Skelettentwicklung und der Genregulation.

## 2. Material

### 2.1 Antikörper und rekombinante Proteine

Anti-acetyl-Histon, H3ac ( <i>rabbit</i> )	Upstate (Millipore), Billerica, US
Anti- $\beta$ -Actin pan AB-5 clone ACTN05 ( <i>mouse</i> )	Dianova, Hamburg, DE
Anti-c-FOS (4) ( <i>rabbit</i> )	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, US
Anti-c-JUN (H79) ( <i>rabbit</i> )	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, US
Anti-eIF4 (eukaryotischer Initiationsfaktor 4, <i>rabbit</i> )	Cell Signalling Technology, Danvers, US
Anti-ETS1 ( <i>rabbit</i> )	Abcam, Cambridge, US
Anti-JUNB (N17) ( <i>rabbit</i> )	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, US
Anti-monomethyl-Histon H3 (Lysin 4), H3K4me1 ( <i>rabbit</i> )	Abcam, Cambridge, US
Anti-PTHrP ( <i>rabbit</i> )	Abcam, Cambridge, US
Anti-trimethyl-Histon H3 (Lysin 4), H3K4me3 ( <i>rabbit</i> )	Abcam, Cambridge, US
Anti-trimethyl-Histon H3 (Lysin 9), H3K9me3 ( <i>rabbit</i> )	Abcam, Cambridge, US
Anti-trimethyl-Histon H3 (Lysin 27), H3K27me3 ( <i>rabbit</i> )	Upstate (Millipore), Billerica, US
Anti-IgG <i>control</i> ( <i>rabbit</i> )	Abcam, Cambridge, US
Anti-IgG <i>rabbit</i> HRP <i>conjugated</i> NAS34V	GE Healthcare, München, DE
Anti-IgG <i>mouse</i> HRP <i>conjugated</i>	Sigma-Aldrich, München, DE
Rekombinantes humanes AP1	Promega, Madison, US
Rekombinantes humanes ETS-1	RayBiotech, Norcross, US

### 2.2 Chemikalien und Reagenzien

1 kb DNA <i>ladder</i>	Invitrogen, Karlsruhe, DE
2 – Merkaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, DE
2 - Propanol (Isopropanol)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Agar Agar	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Agarose LE	Biozym, Hamburg, DE
Akrylamid / Bisakrylamid 40%, (39:1)	BioRad, München, DE
Alcianblau 8 GS	Chroma, Rockingham, US
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, München, DE
Ampizillin	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
APS	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ascorbat-2-phosphat	Sigma-Aldrich, München, DE
ATP	Sigma-Aldrich, München, DE
Bacto™ Tryptone	Becton Dickinson, Franklin Lakes, US
BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate), toluidine salt	Sigma-Aldrich, München, DE
Benzyl-Koelenterazin	Sigma-Aldrich, München, DE
Betaine	Sigma-Aldrich, München, DE
<i>BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit</i>	Applied Biosystems, Foster City, US
<i>BigDye® Terminator v1.1, v3.1 5x Sequencing Buffer</i>	Applied Biosystems, Foster City, US
<i>BMB 10 x DIG RNA Labeling Mix</i>	Promega, Madison, US

Boehringer <i>Blocking Reagent</i> (BBR)	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Bradford Reagenz	BioRad, München, DE
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München, DE
BSA (Zellkultur Qualität)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Caseinhydrolysat	Sigma-Aldrich, München, DE
CHAPS	Sigma-Aldrich, München, DE
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Chloroform:Isoamyl Alkohol (24:1)	Sigma-Aldrich, München, DE
COT Human DNA	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
<i>Deoxycholate</i>	Sigma-Aldrich, München, DE
<i>Deoxyribonucleic acid single stranded from human placenta</i>	Sigma-Aldrich, München, DE
DEPC <i>treated water</i>	Invitrogen, Karlsruhe, DE
di-Natriumhydrogen-phosphat	Carl Roth, Karlsruhe, DE
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe, DE
dNTP <i>Set Ultra pure</i> (2' Deoxynucleosid 5' Triphosphat)	Amersham Biosciences, München, DE
DTT	Sigma-Aldrich, München, DE
Dynabeads <i>rabbit anti mouse</i>	Invitrogen (Dyna), Karlsruhe, DE
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe, DE
EGTA	Sigma-Aldrich, München, DE
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ethidiumbromidlösung 1% (10 mg/ml)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
FG, <i>Buffer (10 x) with EDTA</i>	Applied Biosystems, Foster City, US
Ficoll (Typ 400)	Sigma-Aldrich, München, DE
Fluorescein-12-dUTP	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Formamid <i>Ultra pure High Grade</i>	Applied Biosystems, Foster City, US
Formaldehyd 37%	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Fugene 6, HD	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Glukose	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Glutaraldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Glykogen	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Glyzerin	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Glyzin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Hefe tRNA	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Heparin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Hepes	Sigma-Aldrich, München, DE
Heringssperma DNA	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
<i>Hexanucleotid Mix 10 x conc.</i>	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
<i>High MW DNA Markers</i>	Invitrogen, Karlsruhe, DE
hTGF- $\beta$ -1	R&D Systems, Minneapolis, US
Hybrisierungspuffer <i>Perfect Hyb™ Plus</i>	Sigma-Aldrich, München, DE



IPTG	Sigma-Aldrich, München, DE
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Kaliumdihydrogen-phosphat	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Koenzym A	PJK Krauser, Kleinblittersdorf, DE
Levamisole	Sigma-Aldrich, München, DE
LiChrosolv® Wasser für die Chromatographie	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Lipofectamine	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich, München, DE
Luziferin	Biosynth, Staad, CH
Magermilchpulver	BioRad, München, DE
Magnesiumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, München, DE
Maleinsäure	Sigma-Aldrich, München, DE
Methanol	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Natriumacetat	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumbutyrat	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumchlorid	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Natriumcitrat Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumhydroxid Plättchen	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumperchlorat	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich, München, DE
Natriumsulfat	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumtetrapyrophosphat	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natronlauge	Carl Roth, Karlsruhe, DE
NBT ( <i>Nitro blue tetrazolium chloride</i> )	Sigma-Aldrich, München, DE
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich, München, DE
Orange G	Sigma-Aldrich, München, DE
<i>Passive Lysis Buffer</i> 5 x	Promega, Madison, US
Phenol	Sigma-Aldrich, München, DE
Phenol/Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Phenol:Chloroform:Isoamyl Alkohol (25:24:1)	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Phenyl-Benzthiazol	Calbiochem, Darmstadt, DE
<i>Plus reagent</i> für Transfektionen	Invitrogen, Karlsruhe, DE
PMSF	Sigma-Aldrich, München, DE
<i>Polymerase I Nick translation grade</i>	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Polyvinylpyrrolidon	Sigma-Aldrich, München, DE
Proteinase Complete Inhibitoren	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Protein <i>Precision Plus Dual Color</i> Standard	BioRad, München, DE
Restriktionspuffer 1-4	NEB, Frankfurt a. M., DE
rhIGF-1	R&D Systems, Minneapolis, US
Rnase Away®	MBP, Molecular BioProducts, San Diego, US
rRNAsin	Promega, Madison, US

## Material

Safranin O	Sigma-Aldrich, München, DE
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Sarkosyl	Sigma-Aldrich, München, DE
SDS (Sodiumdodezylsulfat) ultrapur	Carl Roth, Karlsruhe, DE
S.O.C. Medium	Invitrogen, Karlsruhe, DE
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	BioRad, München, DE
Tetramethyl-Rhodamine-5-dUTP	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
5 x <i>Transcription Buffer</i>	Promega, Madison, US
Tri-Natriumzitat-Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Tris	Sigma-Aldrich, München, DE
Triton X 100	Sigma-Aldrich, München, DE
Trizol® <i>Reagent</i>	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Tween 20	Sigma-Aldrich, München, DE
X-Gal	Sigma-Aldrich, München, DE
Zoelenterazin	NanoLight, Penkhull, UK
<i>α-dCTPs</i> <sup>32</sup> P	NEN, Waltham, US

## 2.3 Enzyme

Aat II, Acl I, Bcl I, Bgl I, Bgl II, EcoR I, EcoR V, Kpn I, Mlu I, Nco I, Not I, Nru I, Pme I, Pst I, Sac I, Sal I, Sfi I, Spe I, Xba I, Xho I, <i>Antarctic Phosphatase</i> , <i>Quick T4 DNA Ligase</i>	NEB, Frankfurt a. M., DE
Klenow <i>Exonuclease Free</i>	USB, Cleveland, US
Proteinase K	Sigma-Aldrich, München, DE
<i>RNA Polymerase</i>	Promega, Madison, US

## 2.4 Geräte und Laborhilfsmittel

Aliquotierer, Multipette	Eppendorf, Hamburg, DE
CO <sub>2</sub> Inkubator Function Line, Cellsafe	Heraeus Instruments, Hanau, DE
Electronic Digital Pipette (8 Kanal, Multipette)	Integra Biosciences, Fernwald, DE
Elektrophoresekammer B1A, 0029	Rainin, Giessen, DE
Entwicklungsmaschine	Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH, BioRad, München, DE
Gel Fotoeinrichtung BioDoc Analyze	Kodak, Genf, CH
Gießvorrichtung Agaroseblöcke <i>Plug Mold</i>	Biometra, Göttingen, DE
Liquid-Szintillationszähler	Biozym, Hamburg, DE
Mikroplatte <i>Luminometer</i>	Wallac, Rodgau-Jügesheim, DE
Nanodrop ND-1000	Berthold Technologies, Bad Wildbad, DE
PCR System GeneAmp® 9700	Thermo Scientific, Waltham, US
Pulsfeldgelelektrophorese CHEF Mapper™	Applied Biosystems, Foster City, US
Cooling Module, Variable Speed Pump, Electrophoresis Cell	BioRad, München, DE
Realtime PCR: ABI Prism® 7700 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Foster City, US
Sequencer 3130x/Genetic Analyser	Applied Biosystems / Hitachi, Foster City, US

Semidry Blot Apparatur, Tank Blot  
 Speed Vac Concentrator 5301  
 Thermomixer 5436  
 Vortex Mixer  
 Zentrifugen  
 4K15  
 5417R  
 Micro V

BioRad, München, DE  
 Eppendorf, Hamburg, DE  
 Eppendorf, Hamburg, DE  
 Neolab, Heidelberg, DE  
  
 Sigma-Aldrich, München, DE  
 Eppendorf, Hamburg, DE  
 Fisher Scientific, Waltham, US

## 2.5 Kits

Biotin 3' *End DNA Labeling Kit*  
*Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module*  
*Dnase I Amplification Grade*  
*Easy Pure DNA Purification Kit*  
*ECL™ Western Blotting Analysis System*  
 Elongase® Enzym Mix  
*Endotoxin free MAXI Prep Kit*  
*Expand Long Template PCR System*  
*GeneRacer® Kit with Superscript™ III RT*  
 HotStar Taq® DNA Polymerase  
 InviTaq DNA Polymerase  
*LightShift® Chemiluminescent EMSA Kit*  
 QIAprep® Spin *Miniprep Kit*  
*Realtime PCR 2 x SYBR Green Mastermix*  
*RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit*  
 RNase A  
*S.N.A.P purification columns*  
 Taq Gold Polymerase  
 ThermalAce™ DNA Polymerase  
 TOPO TA *Cloning® Kit for Sequencing* pCR®2 Vektor

PIERCE, Waltham, US  
 PIERCE, Waltham, US  
 Invitrogen, Karlsruhe, DE  
 Biozym, Hamburg, DE  
 GE Healthcare, München, DE  
 Invitrogen, Karlsruhe, DE  
 Qiagen, Hilden, DE  
 Roche Diagnostics, Mannheim, DE  
 Invitrogen, Karlsruhe, DE  
 Qiagen, Hilden, DE  
 Invitex, Berlin, DE  
 PIERCE, Waltham, US  
 Qiagen, Hilden, DE  
 Eurogentec, Köln, DE  
 Fermentas, St. Leon-Rot, DE  
 Invitrogen, Karlsruhe, DE  
 Invitrogen, Karlsruhe, DE  
 Applied Biosystems, Foster City, US  
 Invitrogen, Karlsruhe, DE  
 Invitrogen, Karlsruhe, DE

## 2.6 Kompetente *E. coli* Zellen

### Genotyp

TOP10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araΔ139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ-rpsL(StrR) nupG	Invitrogen, Karlsruhe, DE
TOP10F	F' [lacIq Tn10 (TetR)] mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG	Invitrogen, Karlsruhe, DE
OmniMAX 2 T1 <i>Phage-Resistant</i>	F' {proAB lacI <sup>q</sup> lacZΔM15 Tn10(Tet <sup>R</sup> ) Δ(ccdAB)} mcrA Δ(mrr hsdRMS-mcrBC)	Invitrogen, Karlsruhe, DE

	<p>Φ80(lacZ)ΔM15      Δ(lacZYA-argF)U169</p> <p>endA1 recA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1</p> <p>tonA panD</p>	
dam <sup>-</sup> /dcm <sup>-</sup>	<p>ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44</p> <p>galk2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1</p> <p>R(zgb210::Tn10) Tet<sup>S</sup> endA1 rspL136</p> <p>(Str<sup>R</sup>) dam13::Tn9 (Cam<sup>R</sup>) xylA-5 mtl-1</p> <p>thi-1 mcrB1 hsdR2</p>	NEB, Frankfurt a. M., DE
SURE2	<p>e14-(McrA-)      Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171</p> <p>endA1 gyrA96 thi-1 supE44 relA1 lac recB</p> <p>recJ sbcC umuC::Tn5 (Kanr) uvrC</p> <p>[F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr) Amy</p> <p>Camr]</p>	Stratagene, La Jolla, US
XL10 Gold	<p>TetrD(mcrA)183      D(mcrCB-hsdSMR-</p> <p>mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96</p> <p>relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZDM15 Tn10</p> <p>(Tetr) Amy Camr]</p>	Stratagene, La Jolla, US

## 2.7 Plasmidvektoren

c-JUN in pCMV Sport 6	RZPD, Berlin, DE
c-FOS in pCMV Sport 6	RZPD, Berlin, DE
JUNB in pCMV Sport 6	RZPD, Berlin, DE
ETS1 in pcDNA3.1	RZPD, Berlin, DE
pcDNA 3.1	Invitrogen, Karlsruhe, DE
pCMV Sport 6	Invitrogen, Karlsruhe, DE
pCR <sup>®</sup> 2, pCR <sup>®</sup> 4 TOPO	Invitrogen, Karlsruhe, DE
pGL2 basic	Promega, Madison, US
pRL-TK	Promega, Madison, US

## 2.8 Software / Internetseiten

Data Collection Software V3.0 3130x/Genetic Analyser	Applied Biosystems / Hitachi, Foster City, US
Word, Excel, Powerpoint Microsoft <sup>®</sup> 2002	Microsoft, Unterschleißheim, DE
NCBI, <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, US
Oligo <sup>®</sup> V4.0.6	National Biosciences
Photoshop CS	Adobe, München, DE
rVISTA, <a href="http://rvista.dcode.org/">http://rvista.dcode.org/</a> , <a href="http://zpicture.dcode.org/">http://zpicture.dcode.org/</a>	[207]
SeqBuilder™ V6.1.3	DNA Star, Madison, US
SeqMan™ II V6.1	DNA Star, Madison, US
Sequencing Analysis 5.2 Patch 2	Applied Biosystems, Foster City, US
Sigmastat 3.5	Systat Software, Inc., Erkrath, DE
UCSC Genome Browser, <a href="http://genome.ucsc.edu/">http://genome.ucsc.edu/</a>	University of California, Santa Cruz, US
Winglow (Version 1.25.0003)	Berthold Technologies, Bad Wildbad, DE

## 2.9 Verbrauchsmaterialien

<i>Adhesive</i> PCR Film	ABgene, Waltham, US
<i>Cryotube™ Vials</i>	Nunc, Langenselbold, DE
<i>Cell Scraper</i>	Nunc, Langenselbold, DE
Centri Sep Spin <i>Columns</i>	Princeton Separations, Adelphia, US
Combitips plus (5, 10 ml)	Eppendorf, Hamburg, DE
Einmalpipetten (2, 5, 10, 25 ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, US
Gel Blotting-Papiere	BioRad, München, DE
Hyperfilm MP, Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare, München, DE
MicroAmp™ <i>optical 96-well Reaction Plate</i>	Applied Biosystems, Foster City, US
Multiwell –Zellkulturplatten (6, 12, 24, 48, 96 <i>wells</i> )	Corning Incorporated, Corning, US
Nitrozellulosemembran Protran	Whatman, München, DE
Nunc Immuno™ Platten	Nunc, Langenselbold, DE
Nylonmembran Hybond <sup>+</sup> XL	Amersham Biosciences, München, DE
Parafilm®	American National Can™, Chicago, US
Petrischalen (D= 100 mm)	Nunc, Langenselbold, DE
Pipettenspitzen (steril, nichtsteril / 0,1-10, 10-100, 100-1000 µl)	Starlab, Ahrensburg, DE
Rainin <i>tips</i> (10, 250 µl)	Biozym, Hamburg, DE
Reaktionsgefäße "Eppis"	Rainin, Giessen, DE
Thermo-Fast® 96 <i>well plates for PCR, semi-skirted</i>	Eppendorf, Hamburg, DE
Zellkulturflaschen (25, 75 cm <sup>2</sup> )	ABgene, Waltham, US
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	TPP, Trasadingen, CH
	Becton Dickinson, Franklin Lakes, US

## 2.10 Zellen

Lymphoblastoide Zellen (LCLs), Fibroblasten aus Hautbiopsien	Patienten
ATDC5 (murine Teratokarzinomzellen)	Riken Cellbank, Wako, JP
C28/I2 (humane, adulte, immortalisierte Chondrozyten)	Mary B. Goldring, HSS, Weill Cornell, NYC, US

## 2.11 Zellkulturmedien und –zusätze

Accutase	PAA, Pasching, AT
Collagenase D	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
DMEM <i>low glucose</i> (1 g/l), DMEM / Hanks F12 (1:1), Earle´s Medium 199 (1x)	PAA, Pasching, AT
FCS	Biochrom AG, Berlin, DE
ITS X <i>Supplement</i>	Invitrogen (Gibco), Karlsruhe, DE
L-Glutamin 200mM (100x)	PAA, Pasching, AT
PBS	Biochrom AG, Berlin, DE
Penizillin / Streptomycin	Lonza, Basel, CH
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), P8139	Sigma-Aldrich, München, DE
RPMI 1640	PAA, Pasching, AT
Trypsin / EDTA 0,25%	Invitrogen (Gibco), Karlsruhe, DE

### **3. Methoden**

#### **3.1 Zellbiologische Methoden**

##### **3.1.1 Zellkultur**

###### **3.1.1.1 Arbeiten mit Zelllinien**

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurden humane Fibroblastenzelllinien aus Hautbiopsien und durch das Epstein – Barr Virus immortalisierte lymphoblastoide Zellen (LCLs) von Brachydakylie Typ E un- und betroffenen Patienten verwendet. Die durch SV40 immortalisierten humanen Chondrozyten C28/I2 sind adulten Ursprungs und wurden von Prof. Dr. M. B. Goldring aus NYC (USA) bereitgestellt [208] . Die murinen, einem Teratokarzinom entstammenden ATDC5 Zellen, wurden von der Riken Cellbank Japan erworben.

Die Fibroblasten wachsen adhärent und wurden in EMEM 199, komplettiert mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penizillin und 100 µg/ml Streptomycin, kultiviert. LCLs wachsen als Suspensionszellen in RPMI Medium 1640, komplettiert mit 20% FCS, 100 U/ml Penizillin und 100 µg/ml Streptomycin.

Adhärenzte C28/I2 und ATDC5 Chondrozyten wurden in DMEM / Hanks F12 (1:1), komplettiert mit 10% bzw. 5% FCS, kultiviert. ATDC5 Zellen können durch den Zusatz von Insulin – Transferrin – Selenium (ITS, 1:100) in unterschiedliche chondrogene Stadien differenziert werden. Die chondrogene Induktion von Fibroblasten wurde in Falcontubes mit 500 µl DMEM (10% FCS, L-Glutamin, 100 U/ml Penizillin, 100 µg/ml Streptomycin, 500 ng/ml IGF-1, 10 ng/ml TGF-β1, 1 x ITS und 50 µM Ascorbat-2-Phosphat) mit MW nach je 4 Tagen für 4 Wochen durchgeführt.

###### **3.1.1.2 Kultivierung und Kryokonservierung**

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Passagierung der Zellen erfolgte je nach Proliferationsgeschwindigkeit etwa einmal monatlich bei den Fibroblasten durch einmaliges Waschen mit PBS und fünfminütiger Accutase-Behandlung und ein- bis zweimal wöchentlich bei den humanen und murinen Chondrozyten durch Trypsin- EDTA Behandlung. LCLs wurden in Suspension bis zu einer Konzentration von  $1 - 2 \times 10^7$  c/ml kultiviert.

Durch Abzentrifugieren der Zellen bei 1100 rpm für 5 min, einmaliges Waschen mit PBS, konnten die Zellen passagiert werden. Abhängig von der Zelldichte und Versuchsplanung

wurden die Zellen zwischen 1:2 (Fibroblasten) und 1:8 (C28/I2, ATDC5) gesplittet. Die Kultivierung erfolgte im begasten Inkubator bei 37°C und 5% Kohlendioxid.

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen abgelöst, 5 min bei 1100 rpm zentrifugiert und das Zellpellet in einem Teil Vollmedium und einem Teil mit 90% FCS, 10% DMSO resuspendiert. Aliquots zu je  $1,5 \times 10^6$  c/ml wurden in Flüssigstickstoff gelagert. Eingefrorene Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C bis zum Gefrierpunkt aufgetaut und durch tropfenweise addiertes, vorgewärmtes Vollmedium aufgenommen. Nach 12 – 24 h erfolgte ein Mediumwechsel, um DMSO-Reste zu entfernen.

### 3.1.1.3 Bestimmung der Zellzahl nach Neubauer

Die in Suspension vorliegenden Zellen wurden in Zellkulturmedium aufgenommen und in der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt. Sie besteht aus vier großen Eckquadraten mit je 16 Feldern, wobei das große Eckquadrat eine Fläche von 1 mm<sup>2</sup> aufweist. Einige Mikroliter Zellsuspension wurden bei aufliegendem Deckglas durch Kapillarkräfte eingesaugt. Gesamtzahl der Zellen pro Milliliter:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{\text{Zellen pro Eckquadrate}}{4} \cdot 10000$$

### 3.1.1.4 Alzianblau und Safranin O Färbung

Der Nachweis von sauren, sulfatreichen Proteoglykanen und sauren Glykosaminoglykanen der extrazellulären Knorpelmatrix erfolgte durch Alzianblau- (pH 2,5) oder Safranin O Färbung [209, 210, 211]. Fibrilläre Kollagene von  $2 \times 10^5$  und  $1 \times 10^6$  Zellen wurden mittels 1% Alzianblau in 3%iger Essigsäure für 30 min oder 6% Safranin O in ddH<sub>2</sub>O angefärbt. Nach 3 Waschschritten in 3% Essigsäure für 2 min bei Alzianblau und 2 Waschschritten für 10 sec mit Ethanol bei Safranin O wurden die Zellen mikroskopisch photodokumentiert.

### 3.1.1.5 Chromatinpräparation für Chromatin - Immunopräzipitation (ChIP)

Pro ChIP [212] wurden  $2,5 \times 10^7$  undifferenzierte ATDC5, 9 Tage durch Insulin-Transferrin-Selenium (ITS) differenzierte ATDC5 oder C28/I2 Zellen mit serumfreien Medium (SFM) gewaschen. Das Crosslinkingreagenz aus 11% Formaldehyd, 0,1 M NaCl, 1 mM Dinatrium EDTA, 0,5 mM Dinatrium EGTA und 50 mM Hepes Puffer pH 8,0 wurde 1:10 mit SFM gemischt und die Oberfläche einer Zellkulturflasche vollständig bedeckt. Nach 10 minütigem Schütteln bei RT wurde die Reaktion durch den Zusatz von 1/20stel 2,5 M Glyzin, abhängig von der eingesetzten Crosslinking-Reagenzmenge, gestoppt. Nach 5 minütiger Inkubation bei RT wurden die Zellen abgeschabt und 7 min bei 1500 rpm pelletiert. Nach

einmaligem Waschen in 4 ml eiskaltem PBS und erneuter Zentrifugation von 5 min bei 2000 rpm wurde das Pellet in 1,5 x Volumen eiskaltem Zelllysepuffer resuspendiert. Die Zelllyse erfolgte 10 min auf Eis, es folgten 5 min Zentrifugation bei 2500 rpm bei 4°C. Nach vorsichtiger Abnahme des Überstands wurde das Pellet in 1 ml eiskaltem Nukleilysepuffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Addition von 0,6 ml IP Dilutionspuffer wurde das Chromatin in einem Bioruptor (Diagenode) 15 min bei 4°C sonifiziert. Das folgende 1%ige Agarosekontrollgel zeigte 400-900 bp große Fragmente. Bei erfolgreicher Sonifizierung wurden die Chromatinfragmente 15 min bei 4°C und 15000 rpm zentrifugiert. 20% Glycerin einer 80%igen Glycerinlösung wurden dem Überstand hinzugefügt, es folgte eine photometrische Konzentrationsbestimmung und die Lagerung bei -80°C.

<b>Zelllysepuffer</b>	<b>Nukleilysepuffer</b>	<b>IP Dilutionspuffer</b>
10 mM Tris pH 8,1	50 mM Tris pH 8,1	20 mM Tris pH 8,1
10 mM NaCl	10 mM EDTA	2 mM EDTA
0,2% NP40	1% SDS	150 mM NaCl
		1 % Triton X 100
		0,01 % SDS
+ Complete Protease	Inhibitoren und 10 mM	Natriumbutyrat

### 3.1.2 Funktionale zellbiologische Methoden

#### 3.1.2.1 Transiente Transfektion

Die Liposomen-vermittelte Transfektion beruht darauf, dass negativ geladene Phosphatgruppen der DNA mit den kationischen und neutralen Lipiden der Liposomen interagieren und Komplexe ausbilden [213]. Diese werden von den Zellen durch rezeptorvermittelte Endozytose oder durch das Verschmelzen der Liposomen mit der Zellmembran aufgenommen. Das eingeschleuste Transgen gelangt zum Zellkern und wird episomal für einige Tage exprimiert oder zufällig stabil in das Wirtsgenom integriert.

$1,5 \times 10^5$  ATDC5 und  $0,8 \times 10^5$  C28/I2-Zellen für Reporterassays, bzw.  $1,5 \times 10^6$  C28/I2 Zellen für *Westernblotting*, wurden 12-36 h vor Transfektion in 12-*well*-Mikrotiterplatten und 100 mm Petrischalen ausgesät. 3  $\mu$ l/*well* *Plus reagent* mit 500 ng/*well* endotoxinfreiem Reporterplasmid und 20 ng pRL-TK (s. 3.5.18) wurden in 47  $\mu$ l SFM gemischt, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, 2  $\mu$ l/*well* Lipofectamine in 48  $\mu$ l SFM zugegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Transfizierte Zellen wurden 48 h bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C inkubiert, dann lysiert und bis zur Luminometermessung bei -20° C gelagert.

Transfektionen für *Westernblotting* wurden mit Fugene HD (22,5  $\mu$ l) pro 7,5  $\mu$ g DNA durchgeführt. Transfizierte Zellen wurden 72 h bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C inkubiert, lysiert und



bis zur Bradford Proteinbestimmung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Standardisierung der Transfektion wurden jeweils gleiche DNA Mengen (insg. 22,5  $\mu\text{g}$ ) transfiziert. Dies fand durch pcDNA3.1 Leervektor-Komplettierung statt.

### 3.1.2.2 Dualer Luziferase-Reportergen-Assay

Es handelt sich hierbei um ein System, bei dem die Transkriptionsaktivität mittels der transient in ATDC5 oder C28/I2 Zellen transfizierten Plasmide pGL2 basic und pRL-TK (Promega) nachgewiesen werden kann [214]. Nach Aktivierung der knorpelspezifischen Transkriptionsfaktoren und der Komplexierung des Transkriptionsapparates an den Promoterbereich wird die Transkription der Luziferase-cDNA initiiert. Durch Messung der Biolumineszenz im Plattenluminometer kann die Transkriptionsaktivierung ermittelt werden. pRL-TK exprimiert konstitutiv das Luziferase-Enzym der Seegurke *Renilla reniformis*. Diese Luziferase dient als interner Standard, lässt eine Aussage über die Transfektionseffizienz jedes Einzelansatzes zu und dient der Normierung.

Die Messung der *firefly*-Luziferase-Aktivität erfolgt nach Zugabe von ATP,  $\text{Mg}^{2+}$  und dem Substrat Luziferin. Luziferin wird in Oxyluziferin und Kohlendioxid umgewandelt und Licht der Wellenlänge 562 nm emittiert. Die gemessene Lichtemission ist proportional zur Menge der Luziferase im Zelllysate und lässt somit Rückschlüsse auf die Transkriptionsrate des Reportergens zu. Eine Messung der *Renilla*-Luziferase-Aktivität erfolgt direkt anschließend durch Änderung des pH-Wertes.

$1,5 \times 10^5$  ATDC5 und  $0,8 \times 10^5$  C28/I2-Zellen wurden in Mikrotiterplatten mit 500 ng/well Reporterplasmid und 20 ng pRL-TK für 48 h transfiziert. Nach Absaugen des Mediums wurden 100  $\mu\text{l}$  1 x *Passive Lysis Buffer* pro well hinzupipettiert, die Zellen für 30 min bei RT auf einem Schüttler lysiert. 20  $\mu\text{l}$  des Lysates wurden in lichtundurchlässige Mikrotiterplatten transferiert und die Aktivität der beiden Luziferase-Proteine im autoinjizierenden Plattenluminometer bestimmt. Die Auswertung fand mittels der Software Winglow (Version 1.25.0003) und Excel® 2002 statt.

<b><i>Photinus pyralis</i> Puffer</b>	<b><i>Renilla reniformis</i> Puffer</b>
200 mM Tris – HCl	25 mM $\text{Na}_4\text{PP}_i$
15 mM $\text{MgSO}_4$	10 mM NaAc
0,1 mM EDTA	15 mM EDTA
25 mM DTT	500 mM $\text{Na}_2\text{SO}_4$
1 mM ATP	500 mM NaCl
0,2 mM Koenzym A	50 $\mu\text{M}$ Phenyl-Benzthiazol
200 $\mu\text{M}$ Luziferin	4 $\mu\text{M}$ Benzyl-Koelenterazin
pH auf 8,0 einstellen	pH auf 5,0 einstellen

Der Dual Luciferase Kit von Promega wurde alternativ zur Detektion verwendet.

## 3.2 Bioinformatische Methoden

### 3.2.1 Oligonukleotiddesign

Die Oligonukleotide wurden mit Hilfe der *Oligo Software V4* erstellt. Folgende Bedingungen wurden berücksichtigt:

Länge	: 18 – 40 bp
GC-Gehalt	: ca. 50%
<i>Annealing</i> – Temperatur	: <i>nearest neighbor method</i> oder $4^{\circ}\text{C} \times (n_{\text{G+C}}) + 2^{\circ}\text{C} \times (n_{\text{A+T}})$
Amplikon für <i>Realtime</i> PCR	100 – 200 bp

Repetitive Elemente (*Repeats*) und Komplementarität zwischen den Oligonukleotiden, bzw. mehrfache genomweite Homologien wurden vermieden. Die Spezifität von Oligonukleotiden, bzw. Sonden wurde mit Hilfe der Datenbank NCBI überprüft. Die Oligonukleotidsynthese wurde von der Firma BioTez (Campus Berlin Buch) durchgeführt.

### 3.2.2 Sondengenerierung für *Southernblotting*

Sonden zur Bruchpunktbestimmung der Translokation wurden für das *Southernblotting* durch PCR (s. 9.1) amplifiziert und geextrahiert. Sequenzen ohne repetitive Elemente, validiert durch den *RepeatMasker Web Server* [215, 216], waren die Grundlage für 750 und 1000 bp lange Sonden. Außerdem wurde ein *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) [217] durchgeführt, wobei genomweit homologe Sequenzen aufgefunden werden. Hochspezifische Sonden konnten generiert werden, die wenig unspezifische Signale im *Southernblotting* garantierten.

Die Sequenzen der Sondenprimer und PCR Bedingungen wie *Annealing*-Temperatur ( $T_m$ ),  $\text{MgCl}_2$  Konzentration [mM], Zyklenzahl (cycl.), Polymeraseart (Taq: *Thermus aquaticus*), Extensionszeit (Ext.) und Produktlänge können Anhang 9.1-3, 5, 6 entnommen werden.

### 3.2.3 Physikalische Kartierung durch Restriktionsendonukleasen von 12p11.2 und 8q13

Basierend auf den Ergebnissen der Metaphase FISH wurde jeweils eine physikalische Karte der zytogenetischen Bande p11.2 von Chromosom 12 und q13 von Chromosom 8 für selten schneidende Restriktasen (*Rarecutter*) Pme I, Acl I, Mlu I, Nru I und Sfi I und häufigere Restriktionsendonukleaseschnittstellen EcoR I, EcoR IV, Sac I, Pst I, Bcl I, Xho I und BamH1 generiert. Die Schnittstellen suchte das Programm *Restriction Mapping*

using *tacg V3* [218] . Die Karten dienten der Sondenauswahl und der Eingrenzung der jeweiligen Bruchpunktregionen auf den derivativen Chromosomen 8 und 12 bei folgenden *Southernblotting* Experimenten.

### **3.2.4 Evolutionäre DNA Konservierung und Identifikation putativer cis-aktiver Regulatoren**

Homologe Sequenzen der Spezies Mensch und Maus wurden durch *zPicture* [219] analysiert und im Folgenden in das datenbankbasierte und vergleichende Sequenzanalyseprogramm *rVISTA 2.0* [207] eingespeist. Regulatorische Vertebraten Sequenzen in der integrierten Transfac Professional V10.2 Datenbank wurden nach optimierter Funktion ausgewählt. Anschließend wurde entweder nach allen bekannten Bindungsmotiven oder selektiv nach spezifischen Transkriptionsfaktoren gesucht. Konservierte Bindungsmotive wurden durch den UCSC *Genome Browser* weiter analysiert. Putative cis-aktive Regulatoren wurden experimentell nur dann untersucht, wenn evolutionäre Sequenzkonservierung zwischen *Homo Sapiens Sapiens* und mindestens vier weiteren Spezies (*Macaca mulatta*, *Mus musculus*, *Canis familiaris*, *Equus caballus*), ein positives siebenfaches Regulationspotential [220, 221] und die *PhastCons* konservierten Elemente [222] bestanden.

### 3.3 Hybridisierungsmethoden

#### 3.3.1 *Southernblotting* mit $^{32}\text{P}$ – markierten Sonden und Strippen von *Southernblot* Membranen

Die durch die PFGE und MAXI Gelelektrophorese aufgetrennten DNA Fragmente wurden mit Hilfe eines Vakuumbloiters auf positiv geladene Nylonmembranen transferiert. Das Gel wurde 20 min in 250 mM HCl zur DNA Depurinierung und 30 min zur Neutralisation in 0,5 N NaOH/ 1,5 M NaCl geschüttelt. Auf dem Vakuumblotter lag das Gel nach der Nylonmembran auf zwei permeablen Filterpapieren und einem semipermeablen Kunststoffträger, unter dem ein konstantes Vakuum von -60 mba für 3 – 4 h aufgebaut war und wurde durchweg mit 0,5 N NaOH/1,5 M NaCl überschichtet.

Zur Entfernung von Agarosepartikeln wurde die Nylonmembran in 2 x SSPE (20 x SSPE: 3 M NaCl, 0,2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 20 mM EDTA, pH 7,4 durch 10 N NaOH) für 15 min geschüttelt und anschließend zur Fixierung der kovalent gebundenen Nukleinsäuren vollständig bei 70°C im Trockenschrank getrocknet. Das Gel wurde erneut angefärbt, um sicherzustellen, dass der erfolgreiche Transfer stattgefunden hat und das Gel nukleinsäurefrei ist. Die Membran wurde bei - 80°C gelagert.

Die Herstellung der  $^{32}\text{P}$  – markierten Sonde basiert auf dem Prinzip des *Random Priming* durch Hexaoligonukleotide, die als Gemisch alle möglichen Kombinationen der vier Basen enthalten und aufgrund der Komplementarität an den denaturierten Einzelstrang der Sonde binden. Sie dienen als Primer für das Klenow Enzym, das die Lücken mit dATG und  $^{32}\text{P}$  -  $\alpha$ -dCTP auffüllt.

Von der PCR generierten Sonde wurden zwischen 100 – 200 ng eingesetzt. Je nach Konzentration der Sonde wurde der Ansatz auf 10  $\mu\text{l}$  mit  $\text{dH}_2\text{O}$  aufgefüllt und mit 2  $\mu\text{l}$  Hexanukleotiden ergänzt. Nach 10minütiger Denaturierung bei 99°C und sofortiger Lagerung auf Eis, wurden 1  $\mu\text{l}$  dATG (100  $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{l}$  Klenow Enzym (10 U/ $\mu\text{l}$ ) und 5  $\mu\text{l}$   $\alpha$ -dCTP  $^{32}\text{P}$  hinzugefügt. Nach 12 h Inkubation bei RT erfolgte der Zusatz von 1  $\mu\text{l}$  Klenow Enzym und 3 – 4 h Inkubation bei 37°C.

Die *Southernblot* – Nylonmembran wurde mit einem Nylonnetz als Platzhalter eingerollt und in der Hybridisierungsflasche für 1 h mit 10 ml *Hybridisation Buffer* (Sigma) bei 66°C vorhybridisiert. Das Volumen der Sonde wurde auf 80  $\mu\text{l}$  mit  $\text{dH}_2\text{O}$  komplettiert, 1  $\mu\text{l}$  für die Einbaumessung im Flüssigscintillationsmesser (LSC) abpipettiert. Das Verwerfen des Überstandes einer vorpräparierten Säule zum Entfernen der überflüssigen Oligo- und Nukleotide wurde durch 2 min Zentrifugation bei 3000 rpm bewerkstelligt. Nach Zentrifugieren der Sonde bei 3000 rpm für 2 min wurde 1  $\mu\text{l}$  für die  $^{32}\text{P}$  - Einbaumessung abgenommen. Das Verhältnis der im LSC ermittelten cpm-Werte (*counts per minute*), vor

Aufreinigung der Sonde durch die Säule und danach, errechnete die Einbaurate von  $^{32}\text{P}$  -  $\alpha$ -dCTP. Nur Sonden mit einer Einbaurate  $\leq 20\%$  wurden für die Hybridisierung verwendet.

Das Volumen der Sonde wurde bestimmt, auf 150  $\mu\text{l}$  mit  $\text{dH}_2\text{O}$  komplettiert, 50  $\mu\text{l}$  SSC, 20  $\mu\text{l}$  COT1-DNA (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), je 4  $\mu\text{l}$  pCA- und pGT – Oligo (5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) addiert und die Sonde für 10 min bei 99°C denaturiert. 20  $\mu\text{l}$  denaturierte Human Plazenta DNA, zusätzlich zur COT1-DNA und den pCA- und pGT – Oligos, verminderten unspezifische Bindungen der Sonde an repetitive Sequenzen auf dem Blot und reduzierten den Hintergrund.

Der Hybridisierungspuffer wurde gewechselt und mit der fertigen Sonde auf dem Blot über Nacht bei 66°C hybridisiert. Die Wasch Puffer I + II wurden auf 65°C vortemperierte. Die Blotmembran wurde für 30 min bei 65°C mit 250 ml Wasch Puffer I im schüttelnden Wasserbad gewaschen. Nach Wechsel auf Wasch Puffer II wurde die Radioaktivität mittels einem Müller – Geiger – Zählrohr jede 2 min bestimmt. Bei einer Aktivität zwischen 15 – 40 Bq wurde die Membran faltenfrei in Folie eingepackt und ü.N. mit Röntgenfilm und Verstärkerfolie zur Reflektion der Radioaktivität auf den Film bei -80°C gelagert. Zeigten sich nach Entwicklung des Films starke Signale bzw. Hintergrund, wurde erneut mit Puffer II gewaschen, bei schwachen Signalen wurde die Exposition bis auf zwei Wochen verlängert. Alternativ zur Signaldetektion mit Filmen wurde bei starken Signalen eine Fujifilm *Imager Plate* verwendet, die nach 6 – 24 h mit einem *Imager Scanner* eingelesen wurde.

#### **20 x SSC pH 7,0**

3 M NaCl

0,3 M Natriumcitrat x 2H<sub>2</sub>O

pH einstellen auf 7,0 mit 10 N NaOH

→ Autoklavieren

#### **Wasch Puffer I**

2 x SSC

0,1% SDS

#### **Wasch Puffer II**

0,1 x SSC

0,5% SDS

Eine Mehrfachverwendung der Nylonmembranen war durch einstündiges Waschen mit 0,5% SDS bei 80°C im schüttelnden Wasserbad möglich. Durch das Detergens SDS wird die Bindung hybridisierter Nukleinsäuren an kovalent gebundene hochmolekulare DNA über Wasserstoffbrücken- und Disulfidbindungen aufgehoben. Signalfreie, d.h. radioaktivitätsfreie Blotmembranen wurden ü.N. durch eine *Imager Plate* validiert und bei -80°C gelagert.

### **3.3.2 Chromatin – Immunopräzipitation (ChIP)**

Durch die ChIP können genomische Regionen, an die DNA-bindende Proteine (bspw. Transkriptionsfaktoren) und Histone gebunden sind, untersucht werden. Ein spezifischer Antikörper bindet an ein DNA-gebundenes Protein, das mit dem Stück sonifiziertem Chromatin über einen Sekundärantikörper und *magnetic beads* aufgereinigt wird.

Auf 25 µg sonifiziertes Chromatin (s. 3.1.1.5 [212] ) wurden  $2 \times 10^7$  antikörperbeschichtete *magnetic beads* eingesetzt. Alle in der ChIP verwendeten IgG Antikörper stammen aus dem Kaninchen. Die *beads* werden einmal mit 300 µl PBS, zweimal mit 0,5% BSA / PBS gewaschen. Nach Resuspension in 50 µl 0,5 % BSA / PBS wurde der Antikörper zugefügt und der Ansatz über Nacht auf einem Rollerinkubator bei 4°C inkubiert.

Die *beads* wurden dreimal mit 400 µl PBS gewaschen, dann 25 µg Chromatin mit 1,67 µl Triton X 100, 0,16 µl 10% Desoxycholate, 0,33 µl Complete Protease Inhibitoren und 1,67 µl 10 x TE addiert. Der Ansatz wurde auf 130 µl mit 0,5 % BSA / PBS aufgefüllt und über Nacht bei 4°C auf dem Rollerinkubator inkubiert. 10 % der eingesetzten Chromatinmenge wurde ohne Antikörper als *input sample* gesondert bei -20°C gelagert.

Die Chromatin – Antikörper Komplexe wurden viermal in 400 µl RIPA Puffer und zweimal in 1 x TE gewaschen. Nach komplettem Verwurf des Überstandes wurden 50 µl Elutionspuffer addiert und der Komplex 10 min bei 67°C mit Vortexpausen alle 2 min inkubiert. Nach 30 sec Zentrifugation bei 13000 rpm wurde der Überstand überführt und mit 100 µl Elutionspuffer, 1 µl RNase A (1 mg/ml) und 12 µl 5 M NaCl versetzt.

Nach der Inkubation über Nacht bei 67°C wurden 3 µl Proteinase K (20 mg/ml) und 1,5 µl Glycogen (10 mg/ml) für 2 h bei 45°C addiert. Die Proben wurden auf 300 µl mit 1x TE verdünnt. Es folgte eine Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol Aufreinigung (s. 3.5.13). *Input samples* wurden 2 x phenolpräzipitiert. Vor 30 minütiger EtOH Fällung bei -80°C wurden 30 µl 3 M NaAc und 5 µg Glykogen addiert. Das luftgetrocknete Pellet wurde in 60 µl dH<sub>2</sub>O resuspendiert und bei -20°C gelagert. Die Messungen erfolgten mittels Tripletbestimmungen in der *Realtime* PCR (s. 3.5.4). Nach folgender Formel wurden die Ergebnisse ermittelt [198] :

$$\Delta\Delta Ct = 2^{-\Delta(Ct \text{ Neg. Ctrl. IgG} - Ct \text{ target})}$$

Die dargestellten Werte wurden durch das 10%ige *input sample* standardisiert und in Bezug gesetzt.

#### **RIPA Puffer (50 ml)**

50 mM Hepes pH 8,0  
1 mM EDTA pH 8,0  
10% NP40  
0,7% Deoxycholate  
dH<sub>2</sub>O (34,8 ml)  
0,5 M LiCl  
1 x Complete Protease Inhibitoren  
Reihenfolge beachten!

#### **Elutionspuffer**

10 mM Tris pH 8,0  
1 mM EDTA  
1% SDS

### 3.3.3 Metaphase-FISH (Fluoreszenz *In Situ* Hybridisierung) durch BAC Hybridisierungen

Die Metaphase-FISH Experimente wurden von Herrn Dr. A. Rump, Medizinische Genetik der Technischen Universität Dresden durchgeführt.

Das Gift der Herbstzeitlose, Colchizin, arretiert die Mitose durch Bindung an Mikrotubuli-Untereinheiten. Die maximal kondensierten Metaphasechromosomen sind Grundlage des Karyogrammes und dienen der physikalischen Kartierung von genomischen Regionen mit einer Auflösungsgrenze von ca. 1 Mb. Der ethanolpräzipitierte markierte BAC (s. 3.5.21) wurde in 12 µl Hybridisierungspuffer für 30 min bei 37°C inkubiert, 5 min bei 80°C im Wasserbad denaturiert, dann 1 h bei 37°C vorhybridisiert. Jeder luftgetrocknete Objektträger mit Nuklei der arretierten mitotischen Zellen wurde mit 120 µl Denaturierungslösung bei RT bedeckt und mit einem 24 x 60 mm Deckglas verdeckelt. Die Denaturierung erfolgte für 90 sec auf einer 72-75°C heißen Platte. Unverzüglich wurden die Glasträger in eiskaltes 70%, 90% und 100% Ethanol für jeweils 3 min getaucht, anschließend luftgetrocknet. Die vorhybridisierte Sonde wurde hinzugegeben, der Träger mit einem 18mm<sup>2</sup> Glas verdeckelt, durch Gummikleber verschlossen, anschließend übernacht bei 37°C im Trockenofen hybridisiert, dann mikroskopisch photodokumentiert.

Hybridisierungspuffer	Denaturierungslösung
50% deionisiertes Formamid	70% deionisiertes Formamid
10% 20 x SSC	3% 20 x SSC
20% dH <sub>2</sub> O, pH auf 7 einstellen	27% dH <sub>2</sub> O
20% 50 % Dextransulfat	pH auf 7 einstellen
Autoklavieren, Lagerung bei 4°C	Autoklavieren, Lagerung bei -20°C

### 3.3.4 *In Situ* Hybridisierung (ISH)

Die ISH wurden von Herrn Dr. S. Stricker (Abt. Prof. Mundlos) am MPI für Molekulare Genetik in Berlin durchgeführt.

Frische Mausembryonen der Tage 12,5 / 13,5 und 14,5 wurden in *Sektionen* von 0,15 µm geschnitten und auf Glasobjektträgern für 30 min getrocknet. 4 % Paraformaldehyd in PBS fixierten die Schnitte für 10 min. Nach dreimaligem dreiminütigem Waschen mit 1 x DEPC / PBS wurde die Acethylierungslösung aus 9,25 g Triethanolamin HCl, 1,12 ml 10 N NaOH und 1,25 ml Acethylether für 10 min hinzugegeben. Eine einstündige Vorhybridisierung in 100 µl Hybridisierungspuffer bei 65°C folgte nach erneutem dreimaligem Waschen für je 5 min mit DEPC / PBS. Es folgte die Denaturierung der Sonde (s. 3.5.19) bei 80°C für 5 min und die darauf folgende Hybridisierung bei 65°C für 16-24 h. Nach Spülen der Objektträger in 65°C warmen 5 x SSC, dreimaligem Waschen in 0,2 x SSC bei 65°C und einmaligem Waschen in 1

X PBS / 0,1% Triton X 100 wurden die Proben mit dem *Blocking*-Puffer für 1h, *Blocking*-Puffer komplettiert mit anti – DIG – Alkalische Phosphatase Antikörper (1:1000 in *Blocking*-Puffer) übernacht bei 4°C inkubiert.

Nach dreimaligem dreiminütigem Waschen in 1 X PBS / 0,1% Triton X 100 wurden die Proben in B3 Puffer für 10 min equilibriert. Invertierte Proben wurden anschließend in 300 µl B4 Puffer bei RT in Dunkelheit zwischen 10 min und 72 h (abhängig von Sondenqualität) unter mikroskopischer Beobachtung entwickelt. Die Reaktion wurde durch einmaliges Waschen mit 1 X PBS / 0,1% Triton X 100 gestoppt, die Proben mit dH<sub>2</sub>O gespült, luftgetrocknet und verdeckelt.

<b>Hybridisierungspuffer</b>	<b>Blocking-Puffer</b>	<b>B4 Puffer</b>
50% Formamid	1 x PBS	45 µl NBT
5 x SSC pH 4,5	0,1% Triton X 100	35 µl BCIP
5 x Denhardts	10% hitzeinaktiviertes Ziegenserum	100 µl 100mM Levamisole
250 µg/ml Hefe tRNA		10 ml B3
500 µg/ml Heringssperma DNA	<b>B3 Puffer</b>	
50 µg/ml Heparin	0,1 M Tris pH 9,5	<b>50 x Denhardts</b>
2,5 mM EDTA	0,1 M NaCl	5 g Ficoll (Typ 400)
0,1% Tween 20	50 mM MgCl <sub>2</sub>	5 g Polyvinylpyrrolidon
0,25% CHAPS	0,1% Tween 20	

### 3.3.5 Whole Mount In Situ Hybridisierung

12,5 Tage alte Mausembryos wurden übernacht bei 4°C in 4% PFA / PBS fixiert. Nach zweimaligem Waschen für 30 min mit PBST auf Eis, folgte die Dehydrierung durch 25%, 50%, 75% Methanol in PBST, dann zweimalig 100% Methanol für jeweils 10 min. Nach PBST Waschen, einstündiger Bleiche in 6% Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), dreimal 10 min Waschen in PBST, 5 min Proteinase K Verdau (20 µg/ml), erfolgte zweimal 5 min waschen in PBST / Glyzin (2 mg/ml), zweimal 5 min in PBST, dreimal 5 min in RIPA (s. 3.3.2), dreimal 5 min in PBST, die Fixierung für 20 min in 4% PFA / 0,2% Glutaraldehyd in PBS, erneutes dreimaliges 5 min Waschen in PBST und zweimal 10 min in Hybridisierungspuffer. Die Embryos wurden 1-3 h bei 65°C in Cryogefäßen vorhybridisiert, anschließend mit DIG markierter RNA-Sonde übernacht hybridisiert.

Im Weiteren wurden die Embryos in 12 *well*/Platten transferiert. Für RNase freie Konditionen wurden trockene mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> getränkte Plastiknetze hinzugelegt, die Embryos zweimal für 30 min bei 65°C in Hybridisierungspuffer, nach Kühlen auf RT 5 min in RNase Lösung (1% RNase (10 mg/ml), zweimal 30 min in RNase Lösung und 5 min in 1:1 RNase / SSC / FA / T inkubiert. Es folgten bei 65°C 2 Waschschrte à 5 min, 3 à 10 min, 6 à 30 min mit SSC / FA /



T, die Kühlung der Embryos auf RT und erneutes Waschen für 10 min in SSC / FA / T / MABT, sowie zweimal 10 min in 1 x MABT. Durch die Inkubation für 1 h bei RT in 10% BBR in 1 x MABT fand die Blockierung statt. Der DIG Antikörper wurde in 1% BBR in MABT für 1 h bei 4°C auf einer rotierenden Plattform als 1:5000 Verdünnung vorbereitet, es folgte die o/n Inkubation mit dem Embryo. Waschschritte bei RT für dreimal 5 min, achtmal 30 min und übernacht bei 4°C mit PBST / 0,05% Levamisole entfernten überschüssigen Antikörper. Dreimaliges Waschen für 20 min fand in frisch angesetztem Alkalische Phosphatase Puffer in einer Mikrotiterplatte, die Färbung in Puffer komplettiert mit 4,5 µl/ml NBT und 3,5 µl/ml BCIP statt. Mikroskopische Beobachtung garantierte die notwendige Färbungsdauer, wenn nötig im Dunklen bei 4°C o/n. Dreimaliges Waschen für 10 min in Alkalische Phosphatase Puffer, die Fixierung in 4% PFA / PBS / 0,2% Glutaraldehyd und 5 mM EDTA, konservierten die gefärbten Embryos. Für photographische Dokumentationen wurden die Proben in 50% Glyzerin geklärt.

**SSC / FA / T**

10% 20 x SSC  
 50% Formamid  
 1% 10%iges Tween 20

**5 x MABT**

0,5 M Maleinsäure pH 7,5  
 0,75 M NaCl  
 0,5% 10%iges Tween 20

**Alkalische Phosphatase Puffer**

100 mM Tris, pH 9.5  
 50 mM MgCl<sub>2</sub>  
 100 mM NaCl  
 0.1% Tween 20  
 5 mM Levamisole

**PBST**

10% 10 x PBS  
 1% 10%iges Tween 20 in DEPC  
 dH<sub>2</sub>O

## 3.4 Mikrobiologische Methoden

### 3.4.1 Transformation

In der vorliegenden Dissertation wurden unterschiedliche Bakterienstämme transformiert (s. Material – Kompetente *E. coli* Zellen). *TOP10* und *TOP10F* Zellen wurden zur Klonierung von PCR Produkten verwendet, *OmniMAX 2 T1 Phage-Resistant*, *dam<sup>-</sup>/dcm<sup>-</sup>* und *SURE2* Zellen waren aufgrund ihres Genotyps rekombinationsdefizienter und eigneten sich bei der Transformation von Konstrukten, die in anderen Stämmen rekombiniert wurden, *XL10 Gold* Zellen wurden aufgrund der Ultrakompetenz ( $\geq 10^9$  cfu/ $\mu$ g pUC18 DNA) für Konstrukte größer als 3 kb eingesetzt. Als Positivkontrolle und zur Messung der Transformationseffizienz wurde pUC18 nach den Vorgaben der Hersteller mitgeführt.

Als *Screening* – Methode für die erfolgreiche Transformation wurde eine Kolonie-PCR von bakteriellen ÜNK (Übernachtskultur in LB-Medium) je nach Primer- und Amplikonanforderungen des klonierten DNA Fragmentes durchgeführt (s. Material – Primer). Jeweils 0,5  $\mu$ l ÜNK dienten als *Template*.

### 3.4.2 Blau – Weiß – Selektion transformierter Bakterienkolonien

Eine zusätzliche Blau-Weiß-Selektion von positiv transformierten Bakterien wurde bei Vektoren durchgeführt, die ein *lacZ*-Gen trugen. *LacZ* kodiert für  $\beta$ -Galaktosidase, deren Promotor durch IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid) induziert wird. Exogenes X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) kann zu Galaktose und einem wasserunlöslichen Indigofarbstoff hydrolysiert werden. Blaue Bakterienkolonien enthalten kein Insert, wohingegen der Einbau eines DNA Fragmentes in die *multiple cloning site* des Vektors das Leseraster des *lacZ*-Gens zerstört und die Kolonien nach Inkubation mit X-Gal weiß bleiben.

Auf 37°C vorgewärmte LB-Agarplatten wurden 40  $\mu$ l X-Gal (40 mg/ml) ausgestrichen, danach 40  $\mu$ l IPTG (100 mM). Eine Verstärkung der Farbtintensität zur offensichtlicheren Selektion bei kleinen bzw. 'hell'-blauen Kolonien erfolgte durch eine zweistündige Inkubation bei 4°C.

### 3.4.3 TOPO TA-Klonierung® von PCR Produkten

Der TOPO TA *Cloning*® Kit basiert auf der Transferase-Aktivität der Taq-Polymerase, die an jedes PCR-Produkt am 3'-Ende ein einzelnes Desoxyadenosin (A) hinzufügt. Der pCR®2-Vector (s. Abb. 12) liegt linearisiert vor und hat einen 3'-überhängenden Desoxythymidin (T)-Rest, an den kovalent die Topoisomerase I gebunden ist. Die komplementären Enden von Vektor und PCR-Produkt werden durch die Ligase-

Eigenschaften der Topoisomerase I miteinander ligiert. Neben den beiden Resistenzgenen Ampizillin und Kanamycin hat der Vektor ein *LacZa-ccdB* Fusionsgen, das als Letalgen innerhalb der multiplen Klonierungsstelle liegt. Findet eine Ligation über die Topoisomerase statt, werden die bakterioziden Eigenschaften des *ccdB* Gens ausgeschaltet und positive rekombinante Plasmidvektoren wachsen nach der Transformation in den Bakterien.

Zur Ligation wurden 1 - 4 µl PCR-Produkt, 1 µl Salz-Lösung und 1 µl TOPO® Vektor verwendet. Nach 5 min Inkubation bei RT konnten die Bakterienzellen transformiert werden.

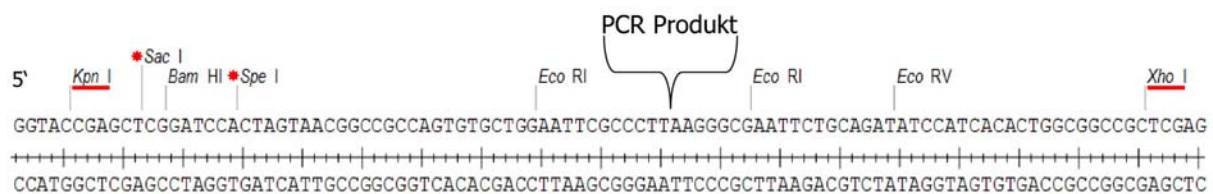


Abb. 12: Multiple cloning site des pCR®2-TOPO Vektors: Rot markierte Restriktionsorte dienten der weiteren Klonierungsstrategie in den Luziferasevektor pGL2 basic (s. 3.5.18).

### 3.4.4 Transformation von *TOP10*, *TOP10F*, *OmniMAX 2 T1 Phage-Resistant* und *dam<sup>-</sup>/dcm<sup>-</sup>* chemisch kompetenten *E. coli* Zellen

Es wurden einmalverwendbare 50 µl *One Shot*® Zellen auf Eis aufgetaut und mit 2 – 10 µl des Ligationsansatzes (10 pg – 100 ng DNA / s. 3.4.3 und 3.5.19) gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 30 sec bei 42°C, um die Aufnahme des Vektors in die Bakterienzelle zu stoppen. Anschließend wurden nach 3 minütiger Inkubation auf Eis 250 µl SOC-Medium zu den Bakterien gegeben. Nach 1 h Inkubation bei 37°C und horizontalem Schütteln bei 300 rpm wurden die Zellen à 100 µl auf 1,5%ige LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampizillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 0,6 ml LB-Medium in 96-*deep well* Platten mit gepickten Kolonien inokuliert und über Nacht bei 37°C und 220 rpm im Schüttelinkubator inkubiert.

Bei *OmniMAX 2*- und *dam<sup>-</sup>/dcm<sup>-</sup>* - Zellen bestand die Möglichkeit 1:10 – 1:50 Verdünnungen des Transformationsansatzes mit LB-Medium herzustellen, diese auszuplattieren und Reste des Ansatzes nach 24 h Lagerung bei 4°C erneut zu verwenden. Rekombinationsereignisse in den Bakterienstämmen wurden durch verlängerte Kultivierung von 24 – 36 h bei 28 – 32°C minimiert.

**LB Medium**

1% NaCl  
 1% Trypton  
 0,5% Hefeextrakt  
 auf pH 7,0 einstellen  
 → Autoklavieren  
 + 50-100 µg/ml Ampizillin oder Kanamycin  
 bei Mediumtemperatur von ca. 55°C

**LB Agar**

s. LB Medium  
 + 1,5% Agar Agar  
 (+ IPTG, X-Gal)

### 3.4.5 Transformation von XL10 Gold und SURE2 chemisch ultrakompetenten *E. coli* Zellen

100 µl auf Eis aufgetaute Zellen wurden in gekühlte Reaktionsgefäße transferiert. Durch die Zugabe von 2 µl β-Mercaptoethanol (1,22 M) wurde die Transformationseffizienz erhöht. Nach fünfmaligem vorsichtigem Schütteln nach jeweils 2 min auf Eis wurden 2 – 8 µl (0,1 – 50 ng DNA) Ligationsansatz (s. 3.5.19) addiert, vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgten der Hitzeschock bei 42°C für 30 sec, 2 min auf Eis, der Zusatz von 400 µl NZY<sup>+</sup> Broth Medium und die einstündige Inkubation bei 37°C mit 225 rpm. Folgeschritte sind analog zu Punkt 3.4.4.

**NZY<sup>+</sup> Broth Medium**

1% NZ Amine (Caseinhydrolysat)  
 0,5% Hefeextrakt  
 0,5% NaCl  
 pH auf 7,5 einstellen  
 → Autoklavieren  
 12,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
 12,5 mM MgSO<sub>4</sub>  
 20% (w/v) Glukose

### 3.4.6 Plasmid-Präparation: MINI / endotoxinfreie MAXI

Die Plasmid Mini-Präparation wurde auf Grundlage der alkalischen Lyse der Bakterien durch NaOH und der anschließenden Reinigung der DNA durch die Adsorption an eine Silika-Membran (Anionenaustauschchromatographie) oder Phenol/Chloroform Extraktion durchgeführt [223]. Präparierte DNA wurde über ein 1%iges Kontrollgel überprüft, die Konzentration im Nanodrop ND-1000 bestimmt. Das Verhältnis der Adsorption von OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> für eine reine DNA Lösung war 1,8. Bei Kontaminationen durch Phenolreste oder Proteine war der Wert signifikant kleiner und die Plasmid-DNA wurde für Folgeexperimente nicht verwendet. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers Qiagen verfahren.

## 3.5 Molekulargenetische Methoden

### 3.5.1 Polymerase Chain Reaction (PCR) Techniken

Durch den zyklischen Prozeß aus Denaturierung, Primer–*Annealing* und Primer–Extension kann ein ausgewählter DNA Abschnitt exponentiell amplifiziert werden. Synthetisierte Oligonukleotide mit einer Länge zwischen 18 und 40 bp hybridisieren jeweils an die komplementäre Stelle des *sense*- bzw. *antisense* DNA Stranges und werden als Startpunkt einer thermostabilen DNA Polymerase genutzt, die durch den Einbau der vier Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) die DNA Sequenz dupliziert [224] .

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden unterschiedliche DNA Polymerasen verwendet. Zwei Eigenschaften, niedrige Fehlerrate und Amplifikation von großen Fragmenten, sind Voraussetzung der thermostabilen Polymerase im Elongase® Enzym Mix (Invitrogen), aus *Thermus aquaticus* (Taq) und *Pyrococcus species* GB-D thermostabilen DNA Polymerasen, die über eine 3' und 5' Exonuklease-Aktivität verfügen, womit es möglich ist, einen DNA Abschnitt von über 12 kb zu amplifizieren. Ähnliche Eigenschaften weisen die Polymerasen des *Expand Long Template* Kits (Roche) auf, womit Amplikons von bis zu 30 kb produziert werden können.

Folgend wird exemplarisch jeweils ein Protokoll angeführt, die genauen PCR Bedingungen sind den Tabellen im Anhang Oligonukleotide zu entnehmen, die möglichen Modifikationen der Protokolle den Produktbeschreibungen der Hersteller (s. Material, 2.5 Kits). Die Taq- und *HotStar* Taq PCR wurden zur Amplifikation von Produkten (Amplikons) bis 1600 bp verwendet. Durch den Zusatz der Q – Solution und Betaine bei *HotStar* Taq, *ThermalAce* und *Expand Long Template* PCR konnten GC-reiche Sequenzen amplifiziert werden [225, 226] .

	<b>Taq PCR</b> [µl]	<b>HotStar</b> <b>Taq</b> [µl]	<b>Thermal</b> <b>Ace</b> [µl]	<b>Expand Long</b> <b>Template</b> [µl]	<b>Elongase</b> [µl]
<b>DNA</b> (50 ng/µl)	1,0	1,0	1,0	2,0	0,5
<b>10 x Puffer</b> (15 mM MgCl <sub>2</sub> )	1,5	5	5	5 (Puffer 1-3)	Puffer A Puffer B
<b>5' Primer</b> (10 pmol/µl)	0,5	0,5	1,5	1,5	0,5
<b>3' Primer</b> (10 pmol/µl)	0,5	0,5	1,5	1,5	0,5
<b>dNTPs</b> (10 mM)	0,375	1,0	1,0 (50 x)	2,5	0,5
<b>Enzym</b>	0,12 (5 U/µl)	0,25 (2,5 U/rxn)	1,5 (3 U/rxn)	0,75 (5 U/µl)	1,0
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1,5 – 3,5 mM	1,5 – 3,5 mM	/	/	1 - 2,6 mM
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	9,2 – 10,4	31,75	38,5	36,75	15 – 19

<b>Q solution</b>	/	10 (5 x)	/	/	/
<b>Betaine</b> (1,2 M)	/	/	mögl.	mögl.	/
<b>Total</b>	15	50	50	50	25

### 3.5.2 PCR Bedingungen

	<b>Taq PCR</b> [°C]	<b>HotStar</b> <b>Taq</b> [°C]	<b>Thermal</b> <b>Ace</b> [°C]	<b>Expand Long</b> <b>Template</b> [°C]	<b>Elongase</b> [°C]
<b>Denaturierung</b>	95 / 5'	95 / 15'	98 / 3'	94 / 2'	95 / 2'
<b>Denaturierung</b>	94 / 15''	94 / 30''	98 / 30''	94 / 10'' 94 / 15''	94 / 30''
<b>Annealing</b>	XX / 15''	XX / 30''	XX / 30''	XX / 30'' XX / 30''	XX / 30''
<b>Extension I</b>	72 / 30 – 90''	72 / XX''	72 / XX''	68 / XX' 68 / XX' + 20''/cycl.	68 / XX''
<b>Extension II</b>	72 / 10'	72 / 10'	72 / 10'	68 / 7'	68 / 10'
<b>Kühlphase</b>	4 / ∞	4 / ∞	4 / ∞	4 / ∞	4 / ∞
<b>Zyklen</b>	30 – 40	30 – 40	30 – 40	10 + 20 – 30	30 – 60

### 3.5.3 cDNA Synthese von isolierter total-RNA

Bei der Reversen Transkriptase-PCR (RT-PCR) werden cDNA-RNA-Hybride verwendet. Über die RT-PCR kann gezielt Genexpression nachgewiesen werden.

Alle Arbeitsschritte dieser Methode wurden auf Eis mit RNase-freien Materialien durchgeführt. Zwischen 1 – 5 µg total-RNA wurden mit 1 µl *Random* Hexamerprimer (0,2 µg/µl) versetzt, auf 12 µl mit DEPC Wasser (Diethylpyrocarbonat) komplettiert und 5 min bei 70°C inkubiert. DEPC nimmt kovalente Modifikationen von Histidinresten im aktiven Zentrum von RNasen vor und inaktiviert sie. Hexamerprimer sind 6 bp lange Oligonukleotide, die alle möglichen Kombinationen der vier Basen enthalten. Durch die mehrfache Bindung an komplementäre Stellen der RNA durch Hexamere ist gewährleistet, dass einzelne dNTPs die Lücken auffüllen und das freie OH-Ende der *Random*-Primer Startpunkt der Reversen Transkriptase für die Polymerisationsreaktion ist.

Nach einem Kälteschock auf Eis wurde der Ansatz auf insgesamt 20 µl mit 4 µl Reaktionspuffer (5 x), 1 µl *RiboLock* Ribonukleaseinhibitor (20 U/µl) und 2 µl dNTP Mix (10 mM) aufgefüllt. Vorsichtiges Mischen, 5minütige Inkubation bei 25°C und der Zusatz von 1 µl *RevertAid* M-MuLV Reverse Transkriptase (200 U/µl) komplettierten den Ansatz. Die Reverse Transkriptase des Moloney-Maus-Leukämie-Virus ist eine RNA-abhängige DNA Polymerase

und kann durch ihre hohe Prozessivität cDNA (copyDNA = komplementäre DNA) bis zu 10 kb synthetisieren.

Der 10minütigen Inkubation bei 25°C folgten 60 min bei 42°C für die reverse Transkription und 10 min bei 70°C zur Inaktivierung des Enzyms. Nach Kälteschock auf Eis wurde die cDNA bei -80°C gelagert.

#### 3.5.4 Realtime PCR mit SYBR Green

Die quantitative *Real-Time* PCR basiert auf der Methode der PCR. Fluoreszenzmessungen des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes *SYBR Green I* am Ende jedes Zyklus quantifizieren proportional die Menge der cDNA-basierten Amplikons in der exponentiellen Phase, die durch den *threshold cycle*, bei der die spezifische Fluoreszenz über die Hintergrundfluoreszenz steigt, beschrieben wird.

Standardisiert wurde durch konstitutiv exprimierte *Housekeeper* Gene (z.B. *GAPDH*) oder bei kompetitiven *Realtime* PCRs durch artifiziell klonierte PCR Produkte. 12,5 µl *SYBR Green* Mastermix, 0,75 µl Primer (10 pmol/µl), 1-10 ng/µl cDNA oder sonifiziertes Chromatin, komplettiert mit dH<sub>2</sub>O auf 25 µl waren der Gesamtansatz, der im ABI Prism® 7700 *Sequence Detection System* nach dem Standardprotokoll von 60°C *Annealing*-Temperatur bei 45 Zyklen analysiert wurde. Die Auswertung der Tripletbestimmungen erfolgte nach der  $\Delta\Delta C_t$  Methode.

#### 3.5.5 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

Unbekannte 5' Enden einer cDNA wurden mittels 5' RACE identifiziert. Isolierte total RNA wurde in cDNA umgeschrieben (s. 3.5.3), durch Oligo dT Primer nur vollständige mRNAs isoliert, Phenol-Chloroform-präzipitiert (s. 3.5.13), daraufhin dephosphoryliert und die CAP Struktur entfernt.

Die Methode basiert auf der T4 RNA-Ligation von *GeneRacer*<sup>TM</sup> RNA Primern an das 5' Ende von mRNA ohne CAP Struktur. Danach folgt eine PCR mit einem 5' Gene RACER Primer und einem genspezifischen 3' Primer, sowie eine nested PCR (Primer s. 9.3). Die Präparation der 5' RACE-Produkte erfolgte nach Angaben des Herstellers (Invitrogen). Banden wurden aus Agarosegelen extrahiert, kloniert, sequenziert und durch BLAST genomisch kartiert (s. 3.5.17, 3.4.3, 3.5.6).

#### 3.5.6 DNA Sequenzierung

Das Prinzip der Reaktion beruht auf dem Kettenabbruch- bzw. Didesoxynukleotidverfahren nach Sanger [227]. Der Einbau eines Didesoxynukleotids (ddNTP) bei der Polymerisationsreaktion, dessen freie OH-Gruppe am 3'-Ende fehlt, führt

zum Abbruch der DNA Synthese. Nach der Polymerisationsreaktion besteht der Ansatz aus Sequenzstücken, die jeweils um + 1 ddNTP verlängert sind, wobei die Didesoxynukleotide ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP durch verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe markiert sind, deren Wellenlängen bei der Elektrophorese durch Induktion mit Laser, Licht emittieren und durch eine CCD Kamera detektiert werden.

Die Sequenzreaktion wurde mittels *Big Dye Terminator v1.1 Terminator Ready-Reaction-100*-Kit durchgeführt. 100-250 ng DNA, 333 nM eines Primers, 2 µl *Big Dye* Mix und 1 µl *Big Dye* Puffer (5x) wurden eingesetzt, komplettiert auf 10 µl mit dH<sub>2</sub>O.

Reaktionsansatz und Bedingungen für PCR Produkte, Plasmid DNA, BAC DNA:

	PCR Produkte	Plasmid DNA	BAC DNA
<b>DNA</b>	0,5 µl (2 ng/100 bp)	0,5 µl (100-250 ng)	6,0 µg
<b>Primer</b> (10pmol/µl)	0,5 µl	0,5 µl	1,0 µl
<b>DMSO</b> 100%	/	/	1,0 µl
<b>Denaturierung</b> (98°C)	/	/	5 min
<b>Big Dye Terminator Mix</b>	2,0 µl	2,0 µl	8,0 µl
<b>BDT 5 x RR-Mix-Puffer</b>	1,0 µl	1,0 µl	4,0 µl
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	6,0 µl	6,0 µl	2,0 µl
<b>total</b>	10,0 µl	10,0 µl	20,0 µl

	PCR Produkte Plasmid DNA BAC DNA
<b>Denaturierung</b> (95°C)	3 ´
<b>Denaturierung</b> (96°C)	10 ´ ´
<b>Annealing</b> (50–62°C)	10 ´ ´
<b>Extension</b> (60°C)	4 ´
<b>Kühlphase</b> (4°C)	∞
<b>Zyklen</b>	25 (BACs 45)

### 3.5.7 Ethanol Präzipitation / Aufreinigung der Sequenzreaktion

Eine Ethanolfällung entfernte überschüssige ddNTPs, restliche Oligonukleotide, sowie die Polymerase aus Sequenzreaktionen, bzw. präzipitierte die zu gewinnende DNA. Der Ansatz wurde mit dem fünffachen Volumen 96% Ethanol und 1/10 des Gesamtvolumens 3 M Natriumacetat pH 5,2 gemischt, 30 min bei -80°C inkubiert und anschließend 30 min bei



5000 g zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden 500 µl 80% Ethanol zur pelletierten Sequenzreaktion dazugegeben. Es folgte eine weitere Zentrifugation (15 min, 5000g, RT). Der Überstand wurde sofort verworfen, eventuelle Ethanol-Reste wurden durch eine Überkopfzentrifugation bei 96 *well plates* für 10 sec bei 150 g, oder durch Lufttrocknung entfernt. Nach 10 min Lufttrocknung wurden die Pellets entsprechend (Sequenzreaktionen in 10 µl Wasser) resuspendiert.

5 µl aufgereinigte Sequenzreaktion und 15 µl Formamid (HiDi) wurden für 2 min bei 96°C denaturiert und dann auf Eis gestellt. Die Kapillarelektrophorese wurde am 3130xl *Genetic Analyzer* ABI durchgeführt.

### 3.5.8 Präparation hochmolekularer DNA

90% konfluente Fibroblasten oder  $1 \times 10^9$  LCLs wurden wie unter Punkt 3.1.1.3 geerntet und mit PBS gewaschen. 1100 rpm für 10 min pelletierten die Zellen, die im Weiteren durch Resuspension in 1 ml Lysepuffer (400 mM Tris-HCL pH 8,0, 60 mM EDTA, 150 mM  $\rightarrow$  Autoklavieren, 1% SDS) NaCl aufgebrochen und durch Mischen mit 300 µl 5 M Natriumperchlorat deproteiniert wurden.

Durch folgendes Mischen mit 1,5 ml kaltem Chloroform und 30 min zentrifugieren bei 4500 g bildeten sich 3 Phasen. Nach Überführen der oberen wässrigen Phase in neue Reaktionsgefäße und Fällung der daringelösten DNA durch 1 Volumen Isopropanol folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt von 30 min bei 4500 g. Das Pellet wurde in 2 ml 70%igen Ethanol gewaschen, für 15 min bei 14000 rpm zentrifugiert und luftgetrocknet. 100 µl TE Puffer resuspendierten die DNA. Anschließend an ein 1 %iges Agarosegel als DNA Qualitätskontrolle wurde eine RNase A Behandlung durchgeführt (s. 3.5.14).

### 3.5.9 Präparation hochmolekularer DNA in Agaroseblöcken für Pulsfeldgelelektrophorese

LCLs (*lymphoblastoid cell lines*) der betroffenen und nichtbetroffenen Familienmitglieder wurden 10 min bei 1100 rpm zentrifugiert und das Zellpellet zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellzahl wurde mittels der Neubauer Zählkammer auf  $4 \times 10^7$  Zellen/ml in Zellsuspensionspuffer eingestellt. Vorsichtiges Mischen vermied die Zelllyse, als auch das Scheren der DNA. Nach zehnminütiger Inkubation bei 50°C wurde die Zellsuspension 1:1 mit 2%iger Agarose in destilliertem Wasser versetzt und in die ethanolgereinigten *Plug Mold* Gießvorrichtungen gegossen. Eine 30 minütige Inkubation bei 4°C polymerisierte die Agarose. Die in Agaroseblöcke eingeschlossenen Zellen wurden für 24 h bei 50°C im Hybridisierungsofen in Zelllysepuffer mit Proteinase K lysiert. Nach Pufferwechsel erfolgte die weitere Lyse für 24 h. Nach zweifachem Waschen der Agaroseblöcke mit Waschpuffer für 30

Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von PMSF (1 mM) für 1 h. Die Lagerung der Blöcke fand in Waschpuffer bei 4°C statt.

<b>Zellsuspensionspuffer</b>	<b>Zellysepuffer</b>	<b>Waschpuffer</b>
10 mM Tris pH 7,2	100 mM EDTA pH 8,0	20 mM Tris pH 8,0
20 mM NaCl	1% Sarkosyl (N-Lauroylsarcosine)	50 mM EDTA
50 mM EDTA	1 mg/ml Proteinase K	1 mM PMSF
	(Zugabe erst vor Gebrauch)	(Zugabe bei drittem Waschen)

### 3.5.10 RNA Präparation aus humanen und tierischen Zellen durch Trizol

Eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit 100% konfluenten Zellen wurde einmalig mit PBS gewaschen, dann 2 ml Trizol hinzupipettiert. Trizol ist eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat, die Zellen lysiert und Ribonukleinsäuren stabilisiert. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden mit Handschuhen und RNase-freien Materialien durchgeführt. Die Zentrifugationsschritte fanden alle bei 4°C statt.

Nach Lagerung der abgelösten Zellen bei -80°C wurden sie zur Eliminierung der Zellbestandteile bei 12000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde pro 1 ml mit 0,2 ml Chloroform ergänzt und das Gemisch für 15 sec geschüttelt. 3 minütiger Inkubation bei RT folgten 15 min Zentrifugation bei 12000 g, wodurch sich die RNA in der oberen wässrigen Phase ansammelte. Durch vorsichtiges Abpipettieren der Phase konnte die RNA mit 1 Volumen Isopropanol und  $\frac{1}{10}$  Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 gefällt werden. Der Ansatz wurde für 10 min bei RT inkubiert, erneut bei 12000 g für 10 min zentrifugiert und das Pellet in 2 ml 75%igem Ethanol (1 ml 75% Ethanol / 1 ml Trizol) resuspendiert. Das Pellet trocknete an der Luft nach einem letzten Zentrifugationsschritt bei 7500 g für 5 min. Nach Resuspension des Pellets in 50 µl RNase-freiem Wasser, wurde ein DNase – Verdau durchgeführt. Der Ansatz wurde auf insgesamt 60 µl mit 6 µl 10 x Puffer, 0,6 µl DNase (10 U/µl) und 3,4 µl dH<sub>2</sub>O komplettiert, es folgten 15 min Inkubation bei RT, der Zusatz von 6 µl EDTA (25 mM) und die Inaktivierung der DNase Aktivität bei 65°C für 10 min im Thermoblock. Neben einem 0,8%igen Agarose – Kontrollgel, dass die Qualität der präparierten RNA durch die ribosomalen Nukleinsäuren (rDNA) mit 5S, 18S und 28S Einheiten (S = Svedberg Konstante) zeigte, wurde die Konzentration der RNA mittels dem Nanodrop ND-1000 ermittelt. Das Verhältnis der Adsorption von OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> für eine reine RNA-Lösung war 2,0. Bei Kontaminationen durch Phenolreste oder Proteine war der Wert signifikant kleiner und die RNA wurde für Folgeexperimente nicht verwendet.

### **3.5.11 Fragmentierung hochmolekularer DNA in Agaroseblöcken durch Restriktionsendonukleasen**

Die Hälfte eines Agaroseblockes (3 µg hochmolekulare DNA) wurde 30 min in 1 ml 0,1fachen Waschpuffer bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine einstündige Äquilibration in 0,3 ml des jeweiligen Restriktionspuffers. Der Verdau mit *rare cutter*- Enzymen (Pme I, Acl I, Mlu I, Nru I, Sfi I) wurde mit jeweils 60 U bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur über Nacht durchgeführt. Die Agaroseblöcke wurden nach Verwerfen des Restriktionsansatzes in 1 ml Waschpuffer gelagert.

### **3.5.12 Fragmentierung hochmolekularer DNA in Wasser durch Restriktionsendonukleasen**

Für die Restriktion von hochmolekularer DNA für MAXI – Gelelektrophoresen wurden 25 µg DNA eingesetzt. Der jeweilige Verdau erfolgte im 500 µl Ansatz über Nacht mit empfohlenen Temperaturangaben der Hersteller mit 200 bis 800 U der Enzyme EcoR I, EcoR IV, Sac I, Pst I, Bcl I, Xho I und BamH1. Nach jeweils 24 h Inkubation wurde der Verdau durch 1 %ige Agarosegele überprüft und gegebenenfalls durch erneuten Enzymzusatz weiter verdaut.

Anschließend erfolgte die Aufreinigung des Ansatzes durch Phenol / Chloroform (s. 3.5.13). Für die Restriktion von Plasmidvektoren wurden zwischen 1 – 5 µg Vektor-DNA eingesetzt, der Ansatz wurde für 90 min bei vorgegebenen Inkubationstemperaturen gespalten. Die Aufreinigung fand über Gelextraktion (s. 3.5.17) statt.

### **3.5.13 Phenol / Chloroform – Aufreinigung**

Durch die Zugabe von 1 Volumen Phenol und anschließende zweiminütige Zentrifugation bei 14000 rpm wurden Proben von Proteinen gereinigt. Die wässrige obere Phase wurde in ein neues Reagenzgefäß überführt und mit 1 Volumen Chloroform / Isoamylalkohol (24:1) gemischt. Nach erneutem zweiminütigen Zentrifugieren bei 14000 rpm wurde wieder die obere Phase in ein neues Gefäß überführt. Die Präzipitation der DNA fand über die Zugabe von 1 Volumen Isopropanol oder 5 Volumen 99 %igem Ethanol und  $\frac{1}{10}$  Volumen 3 M NaAc pH 5,2 statt. 10 min Fällung bei -80°C und 10 min Zentrifugation pelletierten die DNA, die nach anschließendem Waschen mit 70% Ethanol und 5 min Zentrifugation luftgetrocknet wurde. Je nach Menge und Experimentbedingungen wurde die DNA in geeigneter Menge dH<sub>2</sub>O oder 10 mM Tris-HCl resuspendiert.

### 3.5.14 RNase A Behandlung

Für die Behandlung von hochmolekularer DNA aus humaner Zellkultur wurden zu 100 µl DNA zur Volumenvergrößerung 400 µl dH<sub>2</sub>O gegeben, um bei anschließender Phenol / Chloroform Aufreinigung genug DNA – haltigen Überstand zu garantieren (s. 3.5.13). 2 µl RNase A (10 mg/ml) wurden für eine Endkonzentration von 50 µg/ml im 500 µl Ansatz eingesetzt. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37°C wurde phenol-chloroform-präzipitiert. Nach Resuspension des Pellets in 50 µl TE Puffer folgte ein weiteres Agarosekontrollgel.

### 3.5.15 Agarosegelelektrophorese

DNA wandert aufgrund ihrer negativen Ladung, wobei die Ladungsträger die negativ geladenen Phosphatgruppen des Zucker – Phosphat Rückgrats sind, zur Anode. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit abhängig von der Agarosekonzentration, der angelegten Spannung, des Laufpuffers, des interkalierenden Farbstoffs und der Größe der DNA Fragmente. Je nach Größe der Fragmente wurden 0,8 – 3%ige Gele mit TAE als Laufpuffer und Orange G als Ladepuffer (1 µl / 4 µl Probe) verwendet. Ethidiumbromid wurde stets als interkalierender Farbstoff für die UV-Detektion benutzt.

#### 50 x TAE Elektrophoresepuffer 1 l

2 M Tris Base  
0,05 M Natrium-EDTA pH 8,0  
57,1 ml konz. Essigsäure

#### Orange G Ladepuffer

50% Glyzerin  
0,5 M Natrium EDTA pH 8,0  
0,5% Orange G

Für die Auftrennung von phenol-chloroform-aufgereinigter, fragmentierter, hochmolekularer DNA wurden 0,8%ige TAE-Agarose-MAXIgele verwendet. *Southernblots* mit Fragmenten zwischen 1 – 16 kb konnten optimal generiert werden. Laufbedingung war 1 x TAE als Puffer, die gesamten gereinigten Ansätze mit je 3 µl Orange G als Ladepuffer, 1 µl Marker III, 6 µl denaturierter *High Molecular Weight* DNA Marker (5 min denaturiert bei 65°C) und 1 µl 1 kb *Ladder* für 20 h bei 50 V. Gele wurden angefärbt und dokumentiert.

### 3.5.16 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) durch CHEF Methode (*Clamped – Homogenous Electric Field*)

Bei der PFGE wechselt das elektrische Feld die Richtung, aufgrund dessen sich hochmolekulare DNA, beschränkt durch die limitierende Mobilität, abwechselnd in die globuläre Form relaxiert und bei Richtungsänderung (Puls) des elektrischen Feldes abhängig von der Molekülgröße neu ausrichtet. So benötigen größere Moleküle proportional mehr Zeit zur Relaxation und Reorientierung als kleinere und wandern im Agarosegel eine geringere Strecke. Bei der CHEF Methode sind die Elektroden hexagonal um das Agarosegel

ausgerichtet, wodurch die elektrischen Feldvektoren jeweils um  $+60^\circ$  bzw.  $-60^\circ$  gegenüber der vertikalen Achse des Gels verschoben sind [228] .

Durch *rare cutter* Endonukleasen fragmentierte hochmolekulare DNA in Agaroseblöckchen (s. 3.5.11) wurde in 1%igen TBE-Agarosegelen in 0,5 x TBE Puffer aufgetrennt (10 x TBE Puffer: 0,9 M Tris Base, 0,9 M Borsäure, 0,02 M Natrium-ETDA pH 8,0). Fragmente zwischen 4 und 500 kb konnten in 22 h bei 6 V/cm, einem Winkel von  $120^\circ$  und einer Impulszeit von 6-60 s separiert werden. Die Temperatur blieb konstant bei  $14^\circ\text{C}$ . Aufgetragene DNA Größenstandards waren 1  $\mu\text{l}$  1 kb *ladder*, 6  $\mu\text{l}$  denaturierter *High Molecular Weight* DNA Marker und  $\frac{1}{3}$  Agaroseblock der *Lambda Ladder*.

Nach den angegebenen Laufbedingungen wurde das Gel mit Ethidiumbromid (50  $\mu\text{l}$ / 500 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ ) für 5 min angefärbt, durch Schütteln in  $\text{dH}_2\text{O}$  für 20 min entfärbt und mit cm-Einheiten eines Lineals photodokumentiert.

### 3.5.17 Gelextraktion von DNA Fragmenten

Die zu analysierenden Banden wurden aus den 0,8 – 3%igen Agarosegelen ausgeschnitten. Die Agarose wurde durch S.N.A.P *columns* (Invitrogen) bei 13000 rpm für 1 min zentrifugiert, das Eluat aufgefangen und bei Notwendigkeit durch Vakuumzentrifugation eingengt.

### 3.5.18 Ligation von Plasmidvektoren und Restriktionsfragmenten

Es wurde eine T4 DNA Ligase verwendet, die sowohl *sticky-*, als auch *blunt-end* Ligationen durchführt. Bei *sticky-end* Ligationen wurde ein 3-fach molarer Überschuss des *Inserts*, bei *blunt-end* Ligationen ein 10-fach Überschuss eingesetzt. Die Konzentration des Vektors war für einen 20  $\mu\text{l}$  Ansatz mit 1  $\mu\text{l}$  *Quick*-Ligase ( $2 \times 10^6$  U/ml) und 2  $\mu\text{l}$  Ligationspuffer (2 x) 50 ng. Ligierte wurde bei RT für 5 min, die Ligationensätze wurden bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Andere Ligasen ligieren über Nacht bei  $14 - 16^\circ\text{C}$ .

Für die Herstellung von Reportergenkonstrukten wurde im ersten Schritt der *PTHLH* Promotor 3080 bp in pCR II TOPO kloniert. Die Schnittstellen Spe I und Xho I dienten der Restriktion (s. Abb. 12). Nach Ligation der synthetisierten Oligos (s. 9.4) über Spe I an den *PTHLH* Promotor wurde dieses Konstrukt in den Sac I, Xho I linearisierten pGL2 *basic* Vektor ligiert. Korrekt transformierte Konstrukte wurden durch PCR basiertes *Screenen* von Bakterienkolonien aufgefunden, anschließendes Sequenzieren verifizierte die Sequenz.

Das Renilla Plasmid pRL-TK wurde zur Messung der Transfektionseffizienz verwendet (s. Abb. 13 unten).

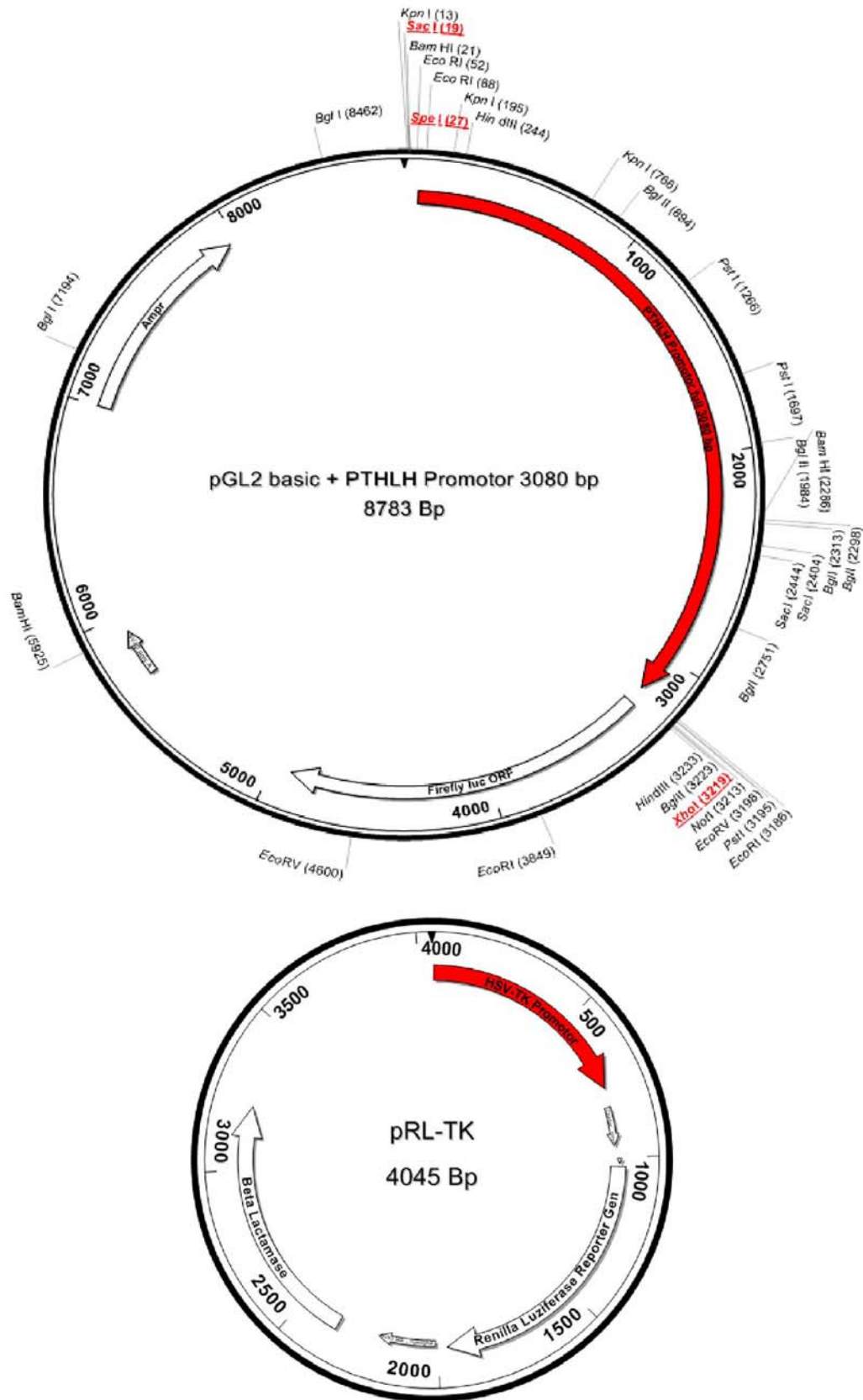


Abb. 13: oben pGL2 basic Luziferasevektor mit PTHLH Promotor (3080 bp) und unten pRL-TK Luziferasevektor zur internen Transfektionskontrolle

### 3.5.19 DIG-RNA-Sonden zur *In Situ* Hybridisierung (ISH) für murines *Kcnb2*

Grundlage der Sonde von 764 bp Länge war das murine Chromosom 1 von 15704673 – 15705436 bp (*Kcnb2*: gi:149233617). Nach TOPO TA Klonierung (s. 3.4.3) und Restriktion (s. 3.5.12) des Inserts, wurde die linearisierte DNA phenol – chloroform-aufgereinigt (s. 3.5.13) und in dH<sub>2</sub>O resuspendiert.

Folgender Mix zur DIG Markierung wurde 2 h bei 37°C inkubiert und über eine Qiagen PCR *purification column* aufgereinigt: 10,5 µl Sonde in dH<sub>2</sub>O, 4 µl Promega 5 x *Transcription Buffer*, 2 µl BMB 10 x DIG RNA *Labeling Mix*, 1 µl 0,1 M DTT, 0,5 µl Promega rRNAsin und 2 µl RNA Polymerase.

### 3.5.20 3' Biotin-Markierung von Oligonukleotiden für EMSA (*Electromobility Shift Assay*)

Die terminale Desoxynukleotidyl-Transferase katalysiert die Desoxynukleotid Inkorporation an 3' OH Enden von DNA. Biotin-11-dUTP wurde nach Protokollangaben des Herstellers PIERCE an einzelsträngige Oligonukleotide transferiert. Eine Chloroform / Isoamylalkohol (24:1) Fällung entfernte das Enzym. Die einstündige Inkubation bei RT von komplementären Oligos (1:1) garantierte die Doppelstrangausbildung. Biotinmarkierte Hybride wurden 1:10 mit dH<sub>2</sub>O für den Einsatz im EMSA verdünnt.

### 3.5.21 Nick Translation für BAC-Sonden

Die DNase I erzeugt ssDNA Brüche, sogenannte *nicks*, die durch die 5'-3' Exonukleaseaktivität der Polymerase I repariert werden. Die 3' OH-Enden der *nicks* dienen als Primer, die Basen werden komplementär in Syntheserichtung eingebaut, wobei Fluorescein- oder Tetramethylrhodamin-fluoreszenzmarkiertes dUTP die Markierung herstellt. Folgender Mix wurde 90 min bei 15°C, zur Enzyminaktivierung 10 min bei 65°C inkubiert.

<b>Labeling Mix</b>	<b>Endkonzentration</b>
DNA	< 150 ng/µl
β-Merkaptoethanol	0,1 M
10 x NT Puffer	0,5 M Tris pH 8,0, 50 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,5 mg/ml BSA
dNTPs	je 0,5 mM dATP, dCTP, dGTP, 0,1 mM dTTP
DNase I	1 mg/ml in 0,15 M NaCl / 50% Glyzerin (1:200 in ddH <sub>2</sub> O)
Polymerase I Nick translation grade	1 mM
*dUTP	1 µl

Anschließend fand eine Ethanol-Präzipitation von ca. 200 ng BAC DNA mit Zusatz von 1 µl Heringssperma-DNA, sowie  $\frac{1}{10}$  des BAC Volumens COT1 DNA statt.

## 3.6 Proteinanalytische Methoden

### 3.6.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Zelllinien

Adhärenente Zellen wurden mit einem Zellschaber gelöst, geerntet und 6 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in Lysepuffer-P (50 mM Tris HCl pH 8,0, 120 mM NaCl, 0,5% NP-40, 5 mM EDTA pH 8,0, 1 Tabl. *Complete* Proteaseinhibitoren / 50 ml) resuspendiert und für 10 min auf Eis gelagert, eine anschließende Zentrifugation (5 min, 13000 rpm, 4°C) entfernte nichtlösliche Proteine und Membranfragmente. Die Proteinlysate wurden in frische Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, die Lagerung erfolgte bei -20°C.

### 3.6.2 Proteinbestimmung für SDS-PAGE

Der Farbstoff Coomassie-Brilliantblau G250 bildet mit Proteinen im sauren Milieu Komplexe aus, wodurch sich das Adsorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm verschiebt. Brilliantblau bindet unspezifisch an kationische und nichtpolare hydrophobe Seitenketten der Proteine [229]. Proteinlysate wurden 1:50 mit Aqua bidest verdünnt, Aliquots als Triplets in einer 96-well-Platte vorgelegt. Die Stammlösung von BioRad, bestehend aus Farbstoff, Ethanol und Phosphorsäure wurde 1:4 mit Aqua bidest verdünnt. Nach Zugabe von 250 µl verdünntem Bradford-Reagenz und fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Proteingehalt der Proben im ELISA-Reader bei 570 nm densitometrisch bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde mit Standardkurven in Excel® berechnet. Ein BSA-Konzentrationsgradient (1 – 12 µg/ml) diente als Eichkurve. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Immunoblots mit 15 µg Protein beladen. Proteinlysate wurden 1:1 mit 2 x Laemmli Puffer (2 ml 0,5M Tris HCl pH 6,8, 20 mg Bromphenolblau, 400 mg SDS, 2 ml Glycerin, ad 10 ml ddH<sub>2</sub>O) und 1 µl 2-Merkaptoethanol komplettiert, für 5 min bei 95°C denaturiert und bis zur Beladung der SDS-Gele bei -20°C gelagert.

### 3.6.3 SDS-PAGE (Sodium-Dodezyl-Sulfat-Poly-Akrylamid-Gel-Elektrophorese)

Mit dieser Methode von Laemmli *et al.* werden Proteine in der denaturierenden reduzierenden Polyakrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrem molekularen Gewicht mittels einer Gelmatrix im elektrischen Feld aufgetrennt. Akrylamid bildet in Gegenwart von freien Radikalen lange Polymere aus, Bisakrylamid (40:1) gewährleistet die Quervernetzung. Radikaldonor ist Ammoniumperoxydisulfat (APS), die Polymerisierungsreaktion wird durch Zugabe des Katalysators TEMED gestartet.

Die Proteine werden durch das Detergens Natriumdodezylsulfat (SDS) denaturiert und mit Sulfatgruppen versetzt, um eine gleichmäßige negative Ladung zu gewährleisten. Aufgrund der Ladung wandern Proteine als scharfe Bande durch die großen Poren des Sammelgels,



wohingegen sie im Trenngel entsprechend ihrer relativen molekularen Masse aufgetrennt werden. Entsprechend der Größe der zu untersuchenden Proteine und zwecks besserer Auftrennung kann die Akrylamidkonzentration des Trenngels variieren. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich 12-14%ige Trenngele verwendet. Mengenangaben für 2 Minigele (8 x 10cm) 12%:

<b>Trenngel</b>		<b>Sammelgel</b>	
Aqua bidest	4,9 ml	Aqua bidest	3,625 ml
40% Akryl-/Bisakrylamid	4,5 ml	40% Akryl-/Bisakrylamid	0,65 ml
1,0 M Tris HCl pH 8,8	5,25 ml	1,0 M Tris HCl pH 6,8	0,625 ml
10% SDS	150 µl	10% SDS	50 µl
10% APS	150 µl	10% APS	50 µl
TEMED	15 µl	TEMED	5 µl

Das Trenngel wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen und zur Gewährleistung einer glatten Oberfläche mit Wasser überschichtet. Nach der Polymerisierung wird das diskontinuierliche Sammelgel mit dem Kamm für die Ladetaschen gegossen. Jeweils zwei Gele wurden in einer Elektrophoresekammer (BioRad) mit Tris/Glyzin-Laufpuffer (5 x Laufpuffer: 124 mM Tris, 960 mM Glyzin, 0,5% SDS, *ad* 1 l ddH<sub>2</sub>O) überdeckt. Der Auftrag der Proben und des Proteinstandards (Marker) erfolgte nach gründlichem Spülen der Ladetaschen.

Laufbedingungen:

80 V → Proteine im Sammelgel

140 V → Trenngel: Laufront des Ladepuffers erreichte nach ca. 90 min den unteren Gelrand

### 3.6.4 Immunoblot (*Westernblotting*)

Der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine erfolgte in Apparaturen der Firma Biometra durch die *semi-dry-blotting* Methode. Das Akrylamidgel wurde auf eine Nitrozellulosemembran gelegt und von jeder Seite mit einem Whatman-Papier eingerahmt. Bei RT transferieren die Proteine innerhalb von 60 min durch einen senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung angelegten Stromfluss von 0,22 mA in die Membran.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für 60 min in 5% Magermilch/ 1% BSA/ TBST geschwenkt. Abhängig von der Antikörperspezifität und Signalstärke variierte die BSA Konzentration beim Blocken bzw. während der Sekundärantikörperinkubation zwischen 0,5 und 2%. Die Bindung des Erstantikörpers in TBST/ 1,5% BSA fand über Nacht bei 4°C statt.

<b>Kathodenpuffer</b>		<b>Anodenpuffer</b>	
2 M Tris HCl pH 7,5	12,5 ml	2 M Tris HCl pH 7,5	150 ml
Ethanol	200 ml	Ethanol	200 ml
Glycin	5,24 g		
ad ddH <sub>2</sub> O	1 l	ad ddH <sub>2</sub> O	1 l

Nach 3 x 10 minütigem Waschen in TBST wurde die Membran für 60 min bei Raumtemperatur mit dem Zweitantikörper (1:5000) in 5% Magermilch/TBST inkubiert. Die an den Zweitantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase katalysierte die enzymatische Nachweisreaktion mit einem Gemisch aus Luminol und Wasserstoffperoxid des ECL (*enhanced chemoluminescence*) – Detektionskits. Die durch den oxidativen Abbau von Luminol entstehenden chemolumineszierenden Signale ( $\lambda = 428\text{nm}$ ) wurden nach 3 – 5 min mittels Röntgenfilm detektiert. Die Belichtungszeiten variierten von 20 sec bis zu 1 h. Die Entwicklung der Filme fand in einem vollautomatischen Kodak-Gerät statt.

Der identische Proteinmengennachweis pro Gelladetasche erfolgte, sofern nicht anders im Ergebnisteil beschrieben, durch Detektion des konstitutiv exprimierten Haushaltproteins  $\beta$ -Aktin. Für eine erneute Inkubation der Membran mit einem weiteren Erstantikörper wurde diese viermal fünf Minuten mit TBST gewaschen und dann für 30 min bei 60°C im Wasserbad mit *stripping buffer* inkubiert. Die Neutralisierung des *stripping-buffers* erfolgte durch Zugabe von 1 M Tris-HCl pH 7,5. Nach erneuten Waschschritten folgte oben beschriebenes Prozedere.

4, 8 und 24 h vor Zelllyse fand eine Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA, 1mg/ml  $\rightarrow$  1:1000) Stimulation für anschliessendes *Westernblotting* statt. Negativkontrollen wurden 1:1000 mit DMSO in VM versetzt. C28/I2 Zellen wurden für 72 h mit unterschiedlichen Expressionsplasmiden transfiziert, lysiert und die Gesamtproteine wie beschrieben präpariert.

<b>TBST</b>		<b><i>stripping-buffer</i></b>	
0,14 M NaCl	8 g	0,2 M Glyzin	7,5 g
2 M Tris HCl pH 7,5	10 ml	0,5 M NaCl	14,61 g
20% Tween 20	2 ml	pH auf 2,8 einstellen	
ad ddH <sub>2</sub> O	1 l	ad 500 ml Aqua bidest	

### 3.6.5 EMSA (Electro Mobility Shift Assay)

In diesem Experiment wird die Interaktion von DNA-bindenden Proteinen (Transkriptionsfaktoren) an biotin-markierten Oligonukleotiden im nativen Polyacrylamidgel untersucht. Minigele im Format 10 x 12 cm wurden mit 5%igem nativem 40% Polyakrylamid / Bisakrylamid (37,5:1), 0,5 x TBE, 0,15% APS und 0,1% TEMED gegossen. Zusätzlich zum PIERCE Bindungspuffer wurde für den Transkriptionsfaktor AP1 0,2 µg/µl Poly (dI-dC) als unspezifischer Kompetitor, 0,05% NP40, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, und 6 pmol/µl unmarkierte spezifische Oligos für 20 µl Gesamtvolumen dazugegeben. Der Bindungspuffer für C-ets-1 bestand aus 20 mM Hepes pH 7,9, 60 mM KCl, 0,2 µg/µl Poly (dI-dC), 8% Ficoll 400, 0,2 µg/µl BSA, 1 µg phenolisiertes, sonifiziertes Heringssperma und 10 mM DTT.

Die Ansätze wurden 15 min bei RT inkubiert, es folgten die Zugabe von 0,3 pfu/µl (~ 180 ng) rekombinant humanes (rh)AP1 bzw. 100 ng rhC-ets-1 und je 12,5 fmol/µl biotin-markiertes spezifisches Oligo. Nach weiteren 20 min Inkubation bei RT wurde das Gel mit den Ansätzen und 3 µl 8% Ficoll 400 als Ladepuffer beladen. Nach 50 min Laufzeit bei 100 V in 0,5 x TBE wurde ein Sandwich – Blot mit Hybond<sup>+</sup> Membran erstellt, der Transfer fand in 0,5 x TBE bei 4°C, 480 mA für 45 min statt. Die Signaldetektion über ECL Plus fand nach den Herstellerangaben des PIERCE chemilumineszenten *nucleic acid detection module* statt.

Expositionszeiten waren zwischen 2 und 13 min, die Filme wurden automatisch entwickelt.

### 3.7 Statistik

Alle in dieser Promotionsarbeit vorliegenden Daten zur Untersuchung biologischer Funktion und Relevanz (ChIP, Reportergerassays, EMSA, Westernblots) wurden mindestens als  $n = 3$  reproduziert. Das arithmetische Mittel mit der Einzelmessung  $x_i$  wurde durch voneinander unabhängig durchgeführte Einzelmessungen ermittelt.

Arithmetisches Mittel:

$$\bar{x} = \frac{1}{n}(x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Mithilfe des Tabellenkalkulations- und Statistikprogrammes Excel® 2002 ließ sich ausgehend von den Einzelmessungen die empirische Standardabweichung errechnen.

Empirische Standardabweichung:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Die Standardabweichung in Prozent, wurde wie folgt berechnet.

$$\text{Standardabweichung \%} = \frac{\text{Standardabweichung} \cdot \text{Mittelwert \%}}{\text{Mittelwert}}$$

Eine Aussage über die Signifikanz eines Ergebnisses wurde durch die Anwendung eines t – Testes mithilfe der Software SigmaStat 3.5 gemacht. Die Wahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,01$  besagt, dass ein Ergebnis als sehr signifikant zu interpretieren ist. Dies ist in Diagrammen mit \*\* gekennzeichnet, während signifikante Ergebnisse ( $p \leq 0,05$ ) mit \* dargestellt werden.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Kartierung der Translokation t(8;12) (q13,p11.2)**

#### **4.1.1 Metaphase-FISH zur Kartierung der Bruchpunktregion**

##### **4.1.1.1 Chromosom 12p11.2**

Die in der Arbeitsgruppe bearbeitete, gemeinsam mit Hypertonie auftretende BDE (Bilginturan Syndrome; OMIM 112410) wurde auf Chromosom 12p kartiert [115, 116, 117, 230, 231, 232]. Es stellte sich die Frage, ob diese und die isolierte Form der Brachydaktylie Typ E durch Veränderungen desselben Gens bedingt sind. Um zu untersuchen, ob es sich bei beiden Familien mit BDE um die identische Region auf Chromosom 12 handelt, wurden YAC-Klone, die den gesamten Kopplungsbereich für Hypertonie/Brachydaktylie überspannen (YAC-*Contig*), für FISH-Untersuchungen an lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) mit t(8;12)(q13;p11.2) genutzt.

In Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik Berlin konnte gezeigt werden, dass der Bruchpunkt der Translokation auf Chromosom 12 proximal zur kosegregierenden Region für autosomal-dominante Hypertonie und Brachydaktylie lokalisiert ist, wodurch ein gemeinsames ursächliches Gen ausgeschlossen werden konnte. Bei dem Bilginturan-Syndrom und der hier vorliegenden BDE handelt es sich um zwei distinkte Krankheitsbilder.

Metaphase-FISH Experimente der Indexpatientin IV:2 kartierten den Bruchpunkt durch flankierende BAC-Klone auf Chromosom 12p11.2. Der Bruchpunkt-überlappende PAC 709 war proximal, die Klone RP11-1151B7 und 336E7 distal zum BP lokalisiert (s. Abb. 14 A). Im finalen FISH Experiment war ein gesplittetes Signal auf den derivativen Chromosomen der(12) bzw. der(8) zu sehen. Die Region wurde aufgrund der BAC-Größe auf 106,7 kb eingengt. Eine balancierte Translokation t(8;12)(q13;p11.2) konnte nach den *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN) Richtlinien detektiert werden (s. Abb. 14 A).

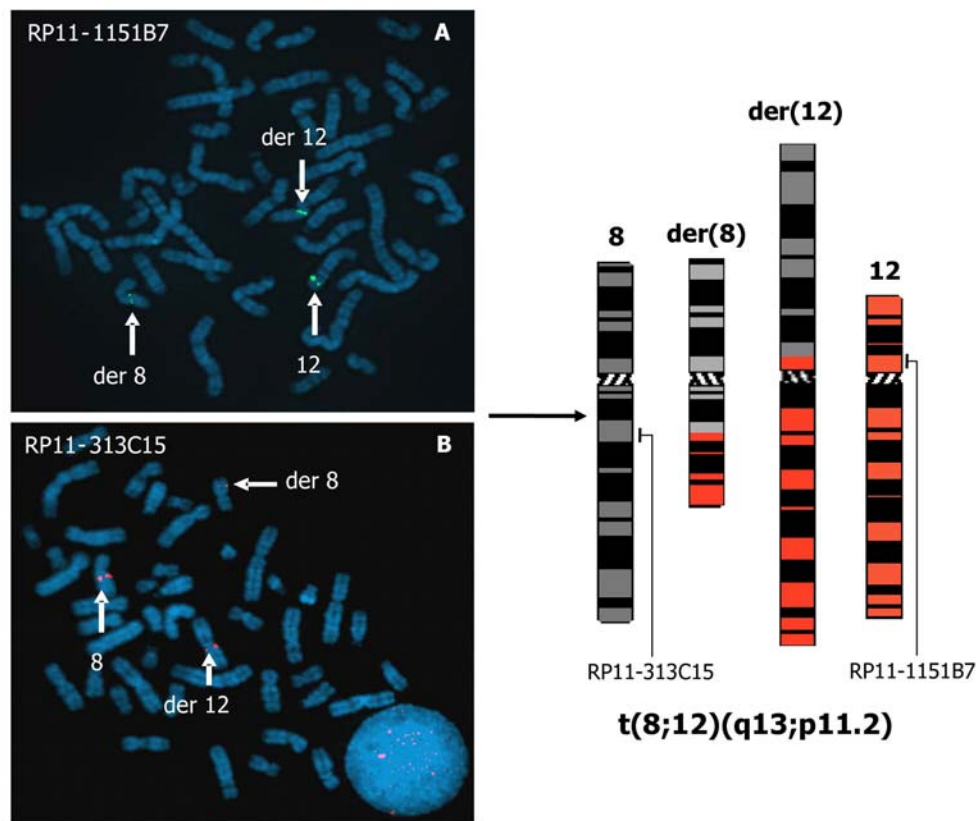


Abb. 14: A: Metaphase-FISH zur Eingrenzung der Bruchpunktregionen mit BAC 1151B7 auf Chromosom 12 (Signal grün FITC), B: Metaphase-FISH mit BAC 313C15 auf Chromosom 8 (Signal rot Tetramethylrhodamin (TMR)); ISCN Ideogramm der in der Metaphase-FISH detektierten Chromosomen 8, 12, der(8), der(12); Genotyp  $t(8;12)(q13;p11.2)$

#### 4.1.1.2 Chromosom 8q13

Das Vorgehen zur Identifikation des Translokationsbruchpunktes auf Chromosom 8 war analog zu dem auf Chromosom 12. Zuerst wurde die Bruchpunktregion durch Metaphase-FISH mit YAC-Klonen auf zwei Megabasen eingeschränkt. FISH-Experimente mit BAC-Klonen kartierten die Bruchpunktregion anfangs auf ca. 375 kb. Durch weitere FISH-Experimente konnte die Bruchpunktregion durch den BAC RP11-313C15 (s. Abb. 14 B) auf 136,8 kb eingegrenzt werden.

#### 4.1.2 Kandidatengensuche auf Chromosom 12p11.2 bzw. 8q13

Anhand der Datenbanken NCBI und UCSC konnten die BACs der Metaphase-FISH genomisch lokalisiert werden, die genomische Umgebung der translozierten Chromosomen der(8) und der(12) wurde kartiert und auf putative Kandidatengene analysiert.

Der proximal zum BP gelegene BAC 993B23 auf Chromosom 12p überspannte das für die Skelettentwicklung essentielle Kandidatengen *PTH1H* (*Parathyroid hormone-like hormone*, s. 1.2.2). In der Bruchpunktregion des Chromosoms 8 liegt das Gen *KCNB2* für den

Kaliumkanal *Potassium voltage-gated channel subfamily B member 2*. Er überspannt 400 kb und setzt sich aus drei Exons zusammen, die für einen in die Zellmembran integrierten heteromultimeren Kaliumkanal von 911 Aminosäuren kodieren.

Sequenzierungen der BAC-Enden und der Abgleich der Sequenzen gegen die genomische Sequenz von Chromosom 8 liessen darauf schließen, dass die Bruchpunktregion einen Großteil von Intron 2 überspannt (s. Abb. 15 B). Diese Daten zeigten, dass als Ergebnis der Translokation auf dem derivativen Chromosom 8, die Exons 2 und 3 des *KCNB2* Gens voneinander getrennt wurden und somit nur noch ein verkürztes, 193 Aminosäuren umfassendes Protein, translatiert werden kann. Diese translatierte hochkonservierte Domäne liegt intrazellulär vor und ist eine BTB (*bric-a-brac*) Domäne. In Säugern dient sie der Transkriptionsrepression, der Tetramerisierung von Proteindomänen und dem Öffnen von Ionenkanälen [233] .

Eine vollständige Sequenzierung von *PTHLH* zeigte keine Mutation, womit diese Ursache für den Phänotyp der Brachydaktylie ausgeschlossen werden konnte.

#### 4.1.3 Physikalische Kartierung durch Restriktionsendonukleasen

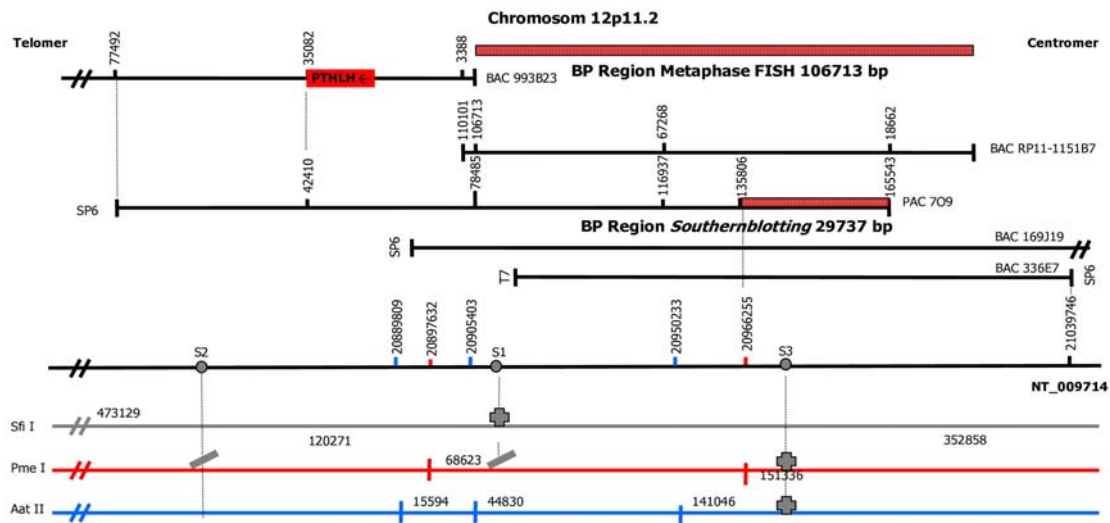
Die spezifischere Lokalisation der Bruchpunkte wurde durch Restriktionskartierung und anschließendes *Southernblotting* durchgeführt, da die Auflösungsgrenze der Metaphase-FISH mittels BAC Hybridisierungen erreicht wurde. In der bioinformatischen Software *Restriction Mapping using tacg V3* wurden die selten schneidenden Restriktionsenzyme Sfi I, Pme I und Aat II ausgewählt, die die Region auf NCBI *Contig* NT\_009714 von 20831442 – 21039746 bp für Chromosom 12p, für Chromosom 8q auf NT\_008183 von 25298080 – 25723892 bp restriktionskartierten (s. Abb. 15 A, B). Die Restriktionskarten zeigen die verwendeten Restriktionsenzyme, die genomischen Positionen der Restriktionsorte, die Sonden für das *Southernblotting*, sowie das zu detektierende Fragment. Sie geben Aufschluß darüber, ob neben dem restriktionskartierten Fragment (-), auch ein transloziertes Fragment des jeweils derivativen Allels im *Southernblot* (+) detektiert wurde.

Die BP Region aus der FISH Analyse konnte von 106713 bp auf 29737 bp auf 12p11.2, bzw. von 136869 bp auf 110182 bp auf 8q13 reduziert werden. Das experimentelle Prozedere und die klärenden Ergebnisse des *Southernblotting* sind unter 4.1.4 beschrieben.

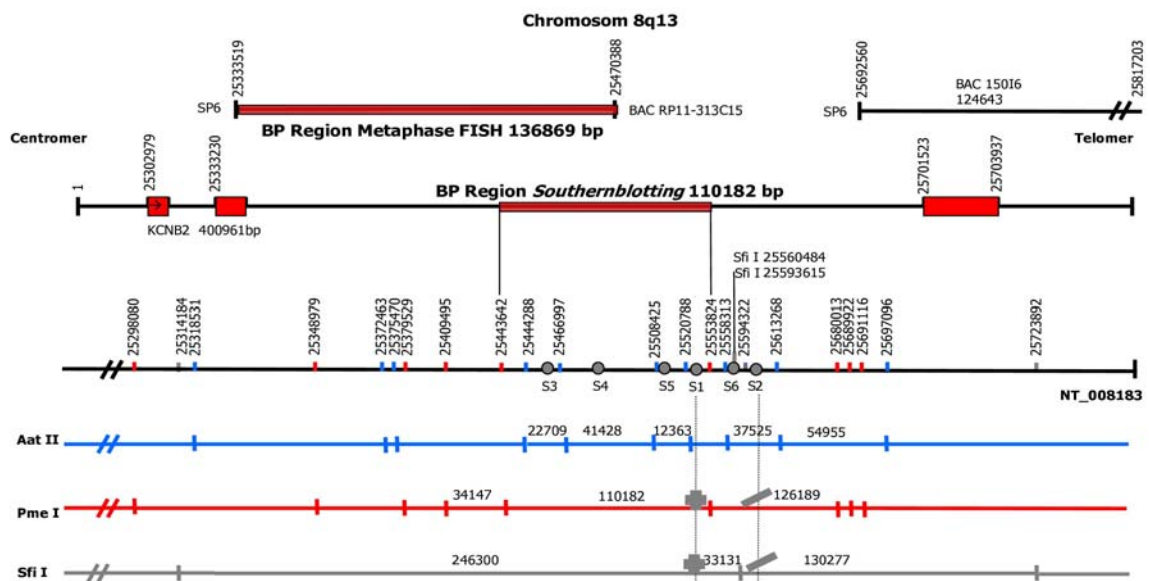
Nach Einengung der kritischen Bruchpunktregionen durch Pulsfeldelektrophorese-basiertes *Southernblotting* auf 12p bzw. 8q wurden Restriktionskarten mit häufiger schneidenden Restriktionsenzymen wie Pst I, EcoR I, Sac I und Bcl I erstellt (s. Abb. 15 C, D). Die darauf basierenden *Southernblots* engten die jeweilige Bruchpunktregion näher ein. Nach erfolgreicher Identifikation der Bruchpunkte war es möglich Restriktionskarten der nächsten

Bruchpunktumgebung zu generieren (s. Abb 15 E). Analog dazu wurden die erwarteten Fragmentgrößen in den *Southernblotting* Experimenten nachvollzogen (s. Abb. 16, 17).

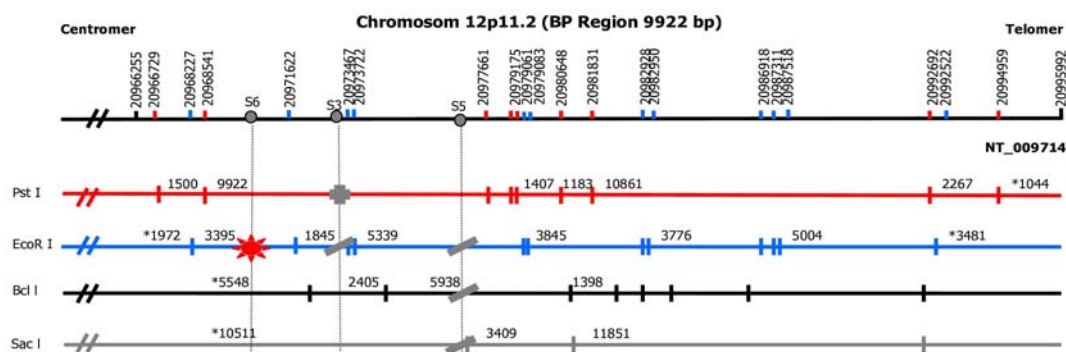
**A**



**B**



**C**





## D-E

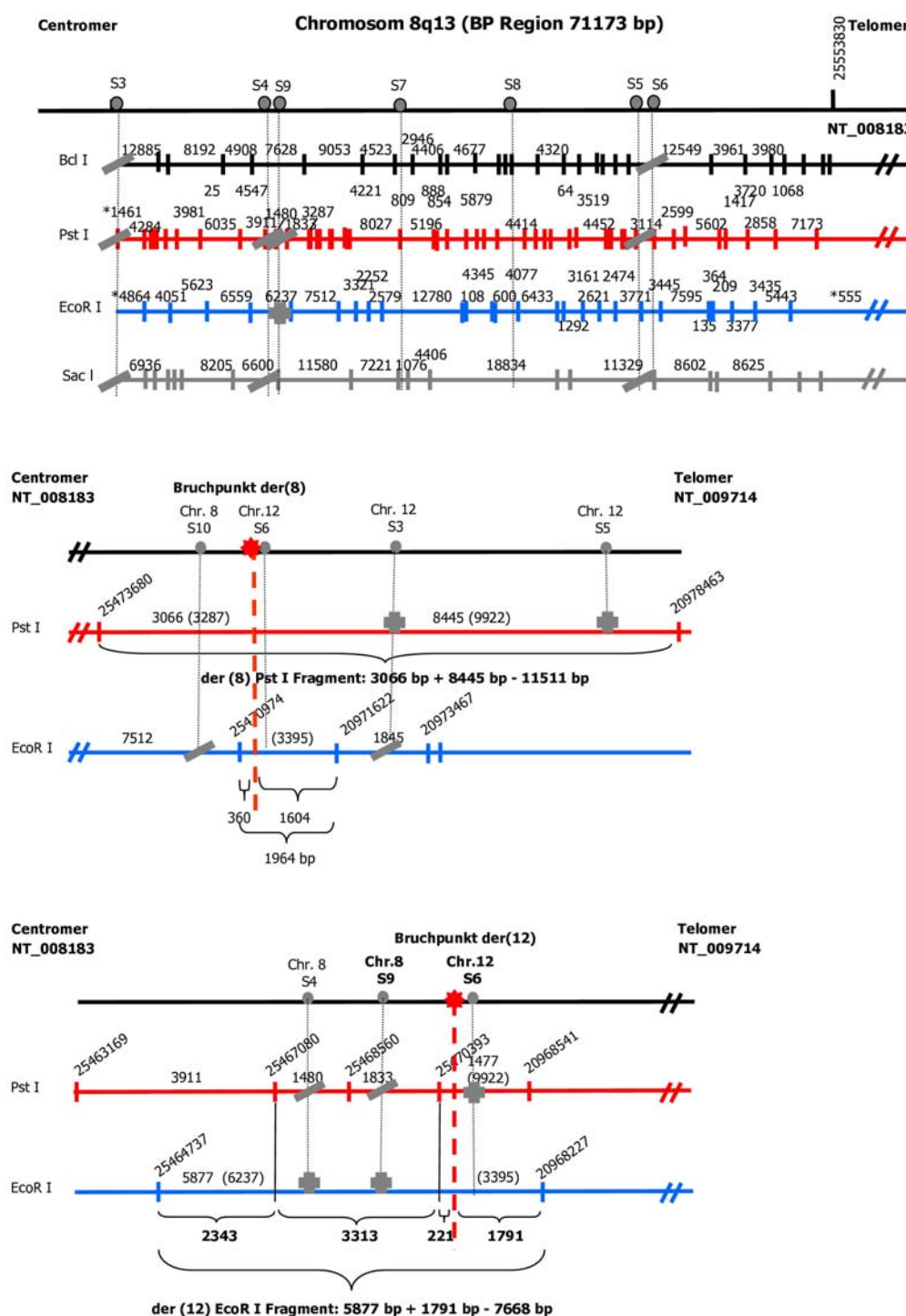


Abb. 15: Restriktionskarten für PFGE- oder MAXI-Gel basiertes Southernblotting; A: Genomische Sequenz aus NCBI Contig NT\_009417 von 20831442–21039746 bp für Chromosom 12p11.2 als Referenz für PFGE-Southernblotting; B: Genomische Sequenz aus Contig NT\_008183 von 25298080–25723892 bp für Chromosom 8q13 als Referenz für PFGE-Southernblotting; C: NT\_009417 von 20966255–20995992 bp als Referenz für MAXI-Southernblotting; D: NT\_008183 von 25482657–25553830 bp als Referenz für MAXI-Southernblotting; E: Rekonstruktion der Restriktionsfragmente an den Bruchpunkten der(8) und der(12); Sn = Southernblot-Sonde, + = positiv identifiziertes Fragment auf einem Southernblot, das neben dem erwarteten Fragment das translozierte Fragment des jeweiligen Chromosoms zeigt; - = erwartetes Fragment, das mit der Restriktionskarte übereinstimmt.

#### 4.1.4 Reduktion der kritischen Bruchpunktregionen durch Pulsfeld-, MAXI-Gelelektrophorese und *Southernblotting*

##### 4.1.4.1 Chromosom 12p11.2

Die Konditionen der Pulsfeldgelelektrophorese (s. 3.5.16) trennte Fragmente von 30 – 500 kb auf. Der *Southernblot* zur Detektion des 473,129 kb Sfi I Fragmentes mit Sonde 1 und 3 (S1, S3) zeigte neben dem erwarteten Fragment des Wildtyp-Allels ein weiteres Fragment von ca. 400 kb des derivativen Chromosoms 8. Zur Einschränkung der kritischen Region wurde anhand der Pme I Restriktionskarte mit S1 und S2 die jeweils erwartete Bande detektiert, S3 zeigte eine zusätzliche Bande bei den drei BDE Patienten von ca. 230 kb. Durch die Metaphase-FISH Experimente mit dem bruchpunktüberspannenden PAC 709 und dem durch S3 positiv identifizierten Pme I Fragment (151,336 kb), konnte die Region auf 29,737 kb eingegrenzt werden (s. Abb 16, 15 A).

Nach Erstellung einer feinauflösenden Restriktionskarte mit den Enzymen Pst I, EcoR I, Bcl I und Sac I wurden Blots auf Basis von MAXI Gelen angefertigt, die einen Auflösungsbereich zwischen 1 – 13 kb erlaubten (s. Abb. 15 C). Die Hybridisierung mit S3 auf einen Pst I Blot identifizierte neben dem erwarteten 9,922 kb Fragment ein weiteres Fragment von 11,511 kb. EcoR I, Bcl I und Sac I Blots mit S5 waren negativ für das derivative Bruchpunktfragment (s. Abb. 16). Sonde S6 detektierte neben dem EcoR I 3395 bp Fragment eine weitere Bande bei den betroffenen Patienten von 1964 bp (Daten nicht gezeigt). Durch die eingegrenzte Region war eine Rekonstruktion der Pst I und EcoR I Bruchpunktfragmente möglich (s. Abb. 15 E).

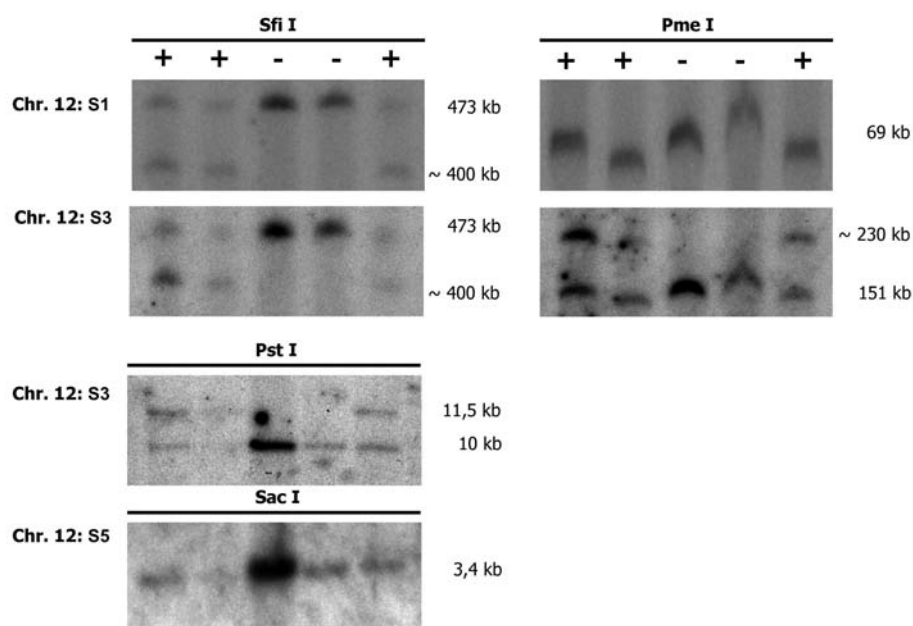


Abb. 16: Southernblotting Experimente basierend auf PFGE- und MAXI-Gelen schränkten die Bruchpunktregion auf der(8) ein. Durch die erwarteten Restriktionsfragmente konnte durch geeignete Restriktionsendonukleasenauswahl und den entsprechenden Sonden die kritische Bruchpunktregion verkleinert werden; + = BDE, - = unbetroffene Familienmitglieder; Lokalisation der gezeigten Fragmente und Sonden sind Abb. 15 A und C zu entnehmen.

#### 4.1.4.2 Chromosom 8q13

Der Vorgang der Bruchpunktlokalisierung auf Chromosom 8q war analog zu 12p. Nach der Identifikation einer weiteren Bande auf dem Sfi I Blot mit S1 von ca. 400 kb, sowie einer 242 kb großen Bande auf dem Pme I Blot, konnte die kritische Region nach den Metaphase-FISH Ergebnissen von 136,869 kb auf 110,182 kb reduziert werden (s. Abb. 15 B). Fragmente, der im zweiten Schritt erstellten Restriktionskarte mit größerer Auflösung, wurden mit S3 – S9 hybridisiert (s. Abb. 15 D). Negative, d.h. nur die erwarteten Banden werden exemplarisch in Abb. 17 anhand von Sac I und Pst I Blots mit den Sonden S8 und S9 dargestellt. Die Hybridisierung von S4 auf ein 6,237 kb großes EcoR I Fragment identifizierte das derivative Bruchpunktfragment von 7,668 kb (s. Abb. 17). Eine rekonstruierte Restriktionskarte der Bruchpunktfragmente war möglich (s. Abb. 15 E).

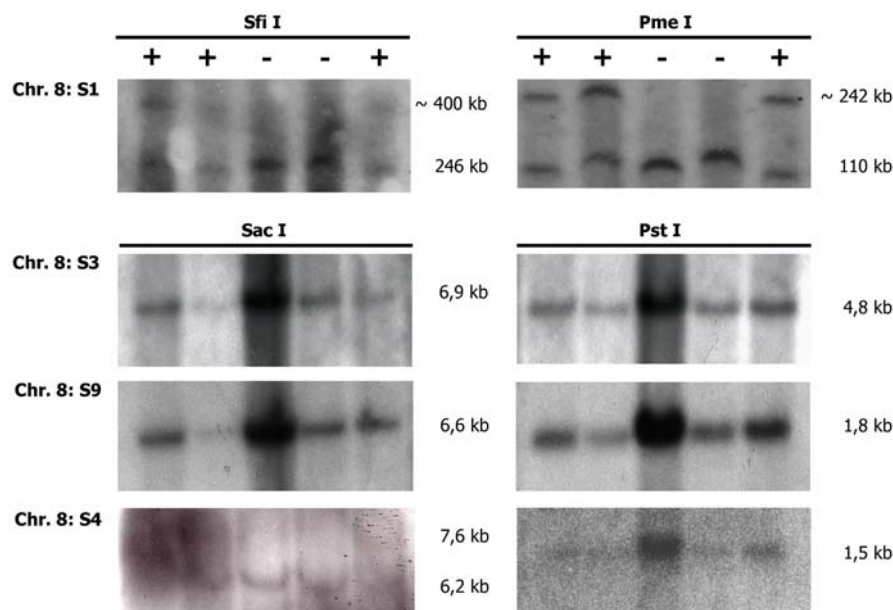


Abb. 17: Southernblotting Experimente basierend auf PFGE- und MAXI-Gelen schränkten die Bruchpunktregion auf der(12) ein. Durch die erwarteten Restriktionsfragmente konnte durch geeignete Restriktionsendonukleasenauswahl und den entsprechenden Sonden die kritische Bruchpunktregion verkleinert werden; + = BDE, - = unbetroffene Familienmitglieder; Lokalisation der gezeigten Fragmente und Sonden sind Abb. 15 B und D zu entnehmen.

## 4.2 Sequenzanalyse der Bruchpunkte

### 4.2.1 Sequenzierung der Bruchpunkte

Die genaue Eingrenzung der Bruchpunkte auf beiden derivativen Chromosomen erlaubte die direkte Sequenzierung. Allelspezifische Primer, die jeweils nur den Bruchpunktbereich eines derivativen Chromosoms amplifizierten, garantierten die Spezifität. Der Bruchpunkt von der(8) wurde durch zwei Vorwärtsprimer Chr.12 S6fw und Chr.8 S9fw, der von der(12) durch zwei Rückwärtsprimer Chr.12 S6rv und Chr.8 S10rv amplifiziert (Primersequenzen s. Anhang 9.1). Nach Klonierung in den Vektor pCR®2 TOPO wurden die Bruchpunkte durch Sequenzierung identifiziert. Der Bruchpunkt von Chromosom 12 ist an der Position 28102311 bp, der des Chromosoms 8 an Position 73779811 bp. Der Bruchpunkt auf Chromosom 8 zeigt nicht wie bei Chromosom 12 einen direkten Übergang auf das translozierte Chromosom 12 entsprechend der bekannten genomischen Sequenz. Eine 5 bp Mikro-Duplikation war nach der Sequenzierung aufzufinden (s. Abb. 18).



Abb. 18: Sequenzanalyse der Bruchpunkte auf der(8) und der(12) durch Amplifikation mit allelspezifischen Primern; oben: der(8), unten der(12); vertikale Striche beschreiben die Mikroduplikation -CTTGG-.

### 4.2.2 Genetische Neuordnung im Bereich der Translokationsbruchpunkte

Die bioinformatische Vorhersage der putativen Kandidatengene nach zytogenetischer und physikalischer Kartierung konnte bestätigt werden. Der Bruchpunkt des derivativen Chromosoms 8 liegt 86,128 kb strangaufwärts des ersten Exons von *PTHLH*. Damit ist das *PTHLH* nicht direkt durch die Translokation betroffen. Die drei Exons von *KCNB2* wurden in Intron 2 durch die Translokation getrennt. Exon 1 und 2 sind auf dem

derivativen Chromosom 8 167,635 kb strangaufwärts des Bruchpunktes lokalisiert, das dritte Exon 233,327 kb auf der(12) (s. Abb.19).

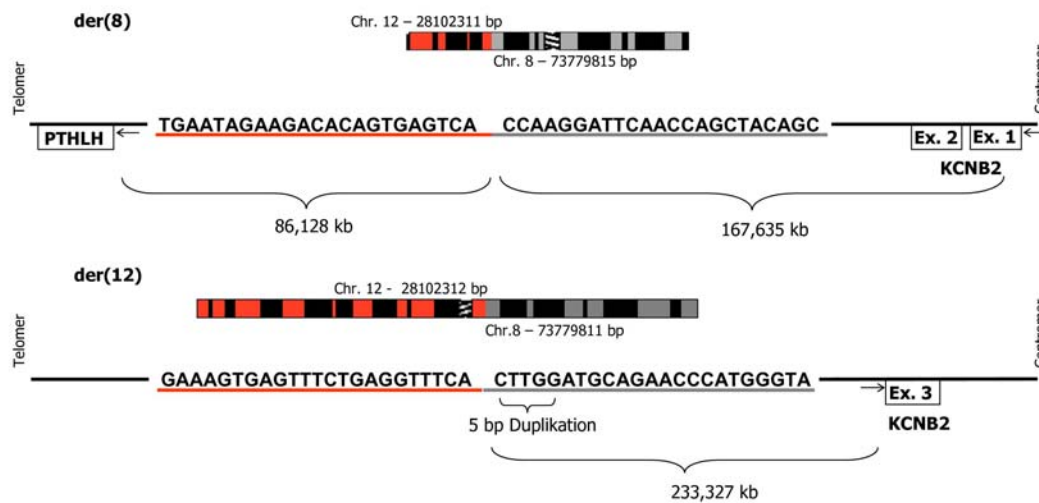


Abb. 19: Genomische Umgebung der Bruchpunkte auf der(8) (oben) und der(12) (unten). Genomische Distanzen zum Transkriptionsstart von PTHLH und KCNB2 auf der(8), bzw. Exon 3 (Ex. 3) von KCNB2 auf der(12), sind in Kilobasen angegeben.

#### 4.2.3 *In silico* Sequenzanalyse der Bruchpunkte für Bindungsmotive modifizierender Enzyme

Der Grund für eine Chromosomenanomalie ist schwierig zu identifizieren, da vielfältige Ursachen, so auch Umweltbedingungen wie Strahlenexposition oder Medikamente, genetische Modifikationen bedingen können. Wie unter 1.4.1 beschrieben, sind bereits aus Ergebnissen onkologischer Pathogenesen zwei DNA-modifizierende Enzyme bekannt, deren Bindungsmotive häufig an Translokationsbruchpunkten zu finden sind. Es handelt sich um Translin und die Topoisomerase II.

Mit Hilfe bioinformatischer Analyseprogramme von DNA-Star wurden *in silico* die Bruchpunktsequenzen der derivativen Chromosomen  $\pm 100$  bp um den jeweiligen Bruchpunkt auf die Konsensussequenzen der Topoisomerase II und Translin (s. Abb. 7, 8) untersucht. Die übereinstimmenden Basen am Bruchpunkt zu denen der Konsensussequenz wurden gezählt und mit den nicht-komplementären verrechnet. Hohe Sequenzhomologien (69 – 89 %) sind bei beiden derivativen Chromosomen am jeweiligen Bruchpunkt für die symmetrische und asymmetrische Konsensussequenz der Topoisomerase II, als auch für Translin auf dem *sense*-, als auch *antisense*-DNA Strang vorhanden. Ein Guanin an Position +2 des Bruchpunktes ist essentiell bei der asymmetrischen Konsensussequenz für einen DNA Doppelstrangbruch [136]. Der *sense*-Strang auf Chromosom 12 zeigt ein Guanin an Position 2 (s. Abb. 20). Ausgehend von bisherigen Erkenntnissen zu beiden Enzymen ist vorstellbar, dass nach den DNA Doppelstrangbrüchen, der Erkennung des dsDNA Endes an Chromosom

12 durch Translin / Trax und des ssDNA Endes an Chromosom 8 durch Translin, der folgenden Auffüllung der überhängenden Enden bzw. *template*-abhängigen Polymerisation am der(12) Bruchpunkt, als ersten Schritt der DNA Reparatur, die ligierende Eigenschaft der Topoisomerase II illegitime Rekombination vermittelt und in Gegenwart von ATP das Translokationsereignis die Folge ist.

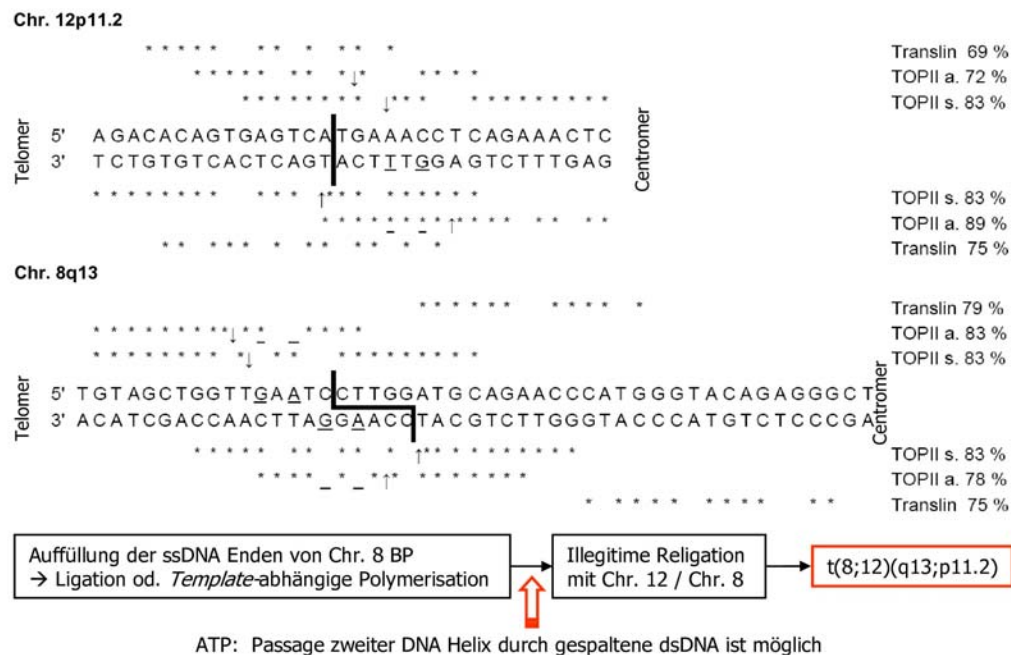


Abb. 20: In silico Sequenzanalyse der Bruchpunkte auf der(8) und der(12) bezüglich Bindungsmotiven für Topoisomerase II und Translin. Sequenzhomologien sind rechts in Prozent angegeben. TOPII s. = symmetrische Topoisomerase II Konsensussequenz, -a = asymmetrisch;  $\uparrow\downarrow$  = Potentielle Restriktionsorte der Topoisomerase II; \* = übereinstimmende Base; \_ = experimentell bestätigte +2 (Guanin) / +4 (Thymin) Position nach Restriktionsort bei asymmetrischer TOPII Konsensussequenz

#### 4.2.4 *In silico* Identifikation der Spezieskonservierung und der Transkriptionsfaktorbindungsstellen (TFBS) an Bruchpunkten der(8) und der(12)

Die genomische Sequenz wurde  $\pm 150$  bp um die Translokations-Bruchpunkte durch den UCSC *Genome Browser* mit integrierten VISTA Optionen auf Konservierung und TFBS untersucht. Abbildung 21 zeigt, dass der Bruchpunkt auf Chromosom 12 innerhalb einer stark konservierten DNA Region liegt, die nahezu homolog unter den Mammalia ist. Die Bruchpunktumgebung auf Chromosom 8 ist minimal konserviert. Rhesus Affen zeigen nichthomologe Sequenzen (Abb. 21 A, B). Mittels UCSC, rVISTA und der Transfac Datenbank wurde ein hochkonserviertes Bindungsmotiv mit putativem Regulationspotential für die Transkriptionsfaktorfamilie AP1 (*Activator Protein 1*) strangabwärts des Bruchpunktes von Chromosom 12 identifiziert, das in Bezug auf *PTHLH* durch die Translokation nicht disloziert



wurde (s. Abb. 21 A). Die Konsensussequenz ist –TGAGTCA–. Auf Chromosom 8 konnte aufgrund der fehlenden Konservierung keine Analyse stattfinden. Visuell wurde allerdings eine EBS Kernkonsensussequenz (ETS *binding site*) mit der Sequenz –GGA<sup>A</sup>/T– ermittelt, die translokationsbedingt von Chromosom 8 disloziert wurde und Ziel der ETS Transkriptionsfaktorfamilie ist (s. Abb. 21 B). Abbildung 21 C zeigt die Bruchpunktsequenz von der(8) und der(12) mit den TFBS für AP1 und ETS. Beide Transkriptionsfaktorfamilien sind ubiquitär exprimiert und regulieren fundamentale Prozesse in der Zelle. Der(8) zeigt ein bidirektionales EBS Motiv, wohingegen durch die 5 bp Mikroduplikation auf der(12) ein neues EBS Motiv gebildet wird. Von diesem Motiv ist auszugehen, dass es keinen genregulatorischen Einfluß hat, da es in einem nichtkonservierten Bereich liegt.

Desweiteren wurden 1,25 Mb genomische Sequenz strangaufwärts der *PTHLH* TSS auf potentiell Chondrogenese-regulierende Transkriptionsfaktoren untersucht. rVISTA identifizierte mehrere hochkonservierte Elemente mit putativem Regulationspotential für die ausgewählten Transkriptionsfaktoren AP1, Sox5, 6, 9, Nkx3.2, Gli1, 3, Smad1, 5, Stat1, Alx4 und Cart1 [36, 234, 235, 236, 237, 238, 239] (Daten nicht gezeigt).

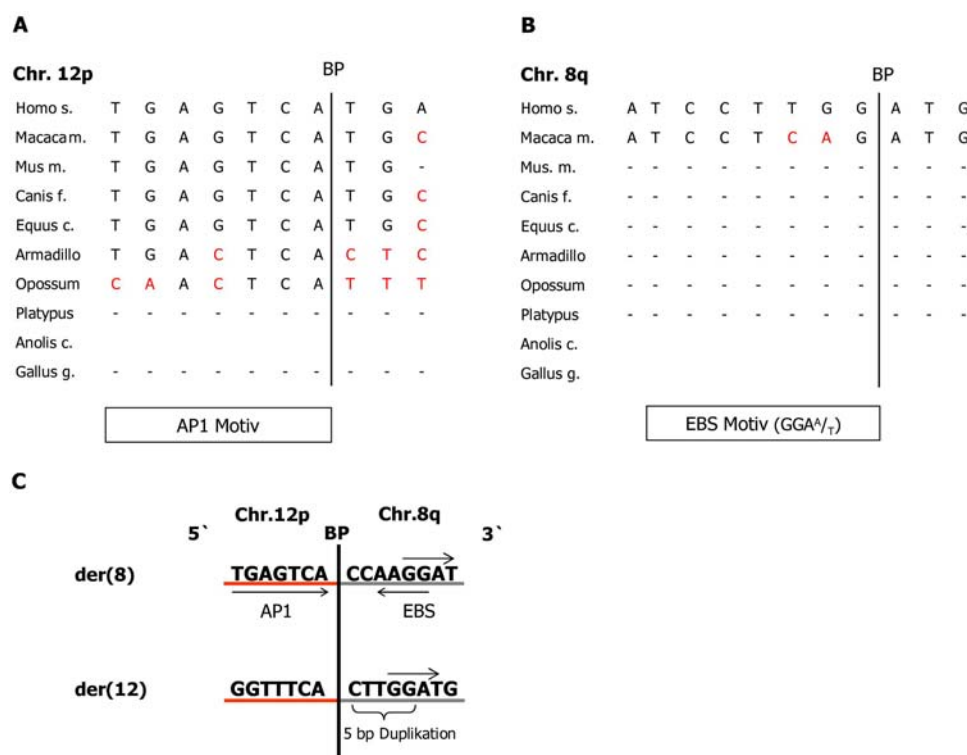


Abb. 21: In silico Analyse der Sequenzkonservierung an Bruchpunkten von t(8;12); A: Chromosom 12 zeigt hohe Sequenzkonservierung unter nahezu allen Mammalia, sowie eine AP1 TFBS distal des Bruchpunktes (BP), während die DNA Region von Chromosom 8 (B) an dieser Stelle nicht konserviert ist und nur durch visuelle Analyse eine bidirektionale EBS Bindungsstelle zu identifizieren ist (Pfeile); Leerzeichen = keine homologe Sequenz; - = eine oder mehr nichthomologe Basen; C: Direkte Umgebung der BP auf der(8) und der(12); Aufgrund der 5 bp Mikroduplikation entsteht eine weitere EBS Kernkonsensussequenz auf der(12).

## 4.3 Potentielle Funktionen von *KCNB2* in der Chondrogenese

### 4.3.1 *Kcnb2 In Situ* Hybridisierung

Der Leserahmen des *KCNB2* Gens wurde durch die Translokation getrennt. Dies hat eine Haploinsuffizienz zur Folge und macht *KCNB2* zum potentiellen Kandidatengen. Die Funktion und Expression des Kaliumkanals *KCNB2* ist bisher unzureichend charakterisiert. Allgemein regulieren K<sup>+</sup>-Kanäle die Kontraktion in Plasmamembranen von glatten Muskelzellen durch die Herstellung eines Membranpotentials über den Influx von Kalium. *KCNB2* ist eine  $\beta$ -Subunit, gehört zur *shab*-Familie, moduliert die Öffnungseigenschaften von  $\alpha$ -Subunits und wird bei Membranpotentialen über -20mV aktiviert. Die bisherige Charakterisierung beschränkt sich auf gewebespezifische Expression in pankreatischen Inselzellen, vaskulären, pulmonalen und uterinen glatten Muskelzellen [240, 241, 242] .

Die potentielle Beteiligung von *KCNB2* in der Chondrogenese und an der Pathogenese der Brachydaktylie Typ E wurde durch *in situ* Hybridisierungen im Mausmodell an transversalen Schnitten (12,5 / 14,5d), Extremitäten von Mausembryonen (12,5 / 13,5d) und Gesamtembryonen (12,5d) untersucht.

Transversale Schnitte der Stadien 12,5 und 14,5 zeigten starke *Kcnb2* Expression in neuronalen, pulmonalen und urogenitalen Geweben. Die neuronal cerebrale Expression beschränkte sich auf *Medulla*, *Pons*, *Hypothalamus*, *Tegmentum* und *Medulla spinalis* (Rückenmark) im Stadium 12,5 (s. Abb. 22 A 1,2). In Stadium 14,5 war *Kcnb2* sehr stark im Innenohr, olfaktorischen Epithelien, dem *Medulla* benachbarten *Cerebellum* und in *Cranialganglien* exprimiert (s. Abb. 22 B 1). Weitere gewebespezifische Expression in beiden Stadien war in Lunge, Niere, der sich entwickelnden Harnblase und dem *Urogenitalsinus* zu finden (s. Abb. 22 A 3,4, B 2,3,4).

Desweiteren stellte sich die Frage, ob die translokationsbedingte Haploinsuffizienz von *KCNB2* phänotypische Merkmale bei betroffenen Patienten zeigt.

Aufgrund der *in situ* Ergebnisse wurden betroffene Patienten anamnetisch zu Gleichgewichtsstörungen und Schwerhörigkeit befragt. Nur der bereits verstorbene Großvater der Indexpatientin (II:2) litt altersbedingt unter Schwerhörigkeit. Sonstige phänotypische Hinweise in Bezug auf den Kaliumkanal *KCNB2* wurden nicht gefunden.



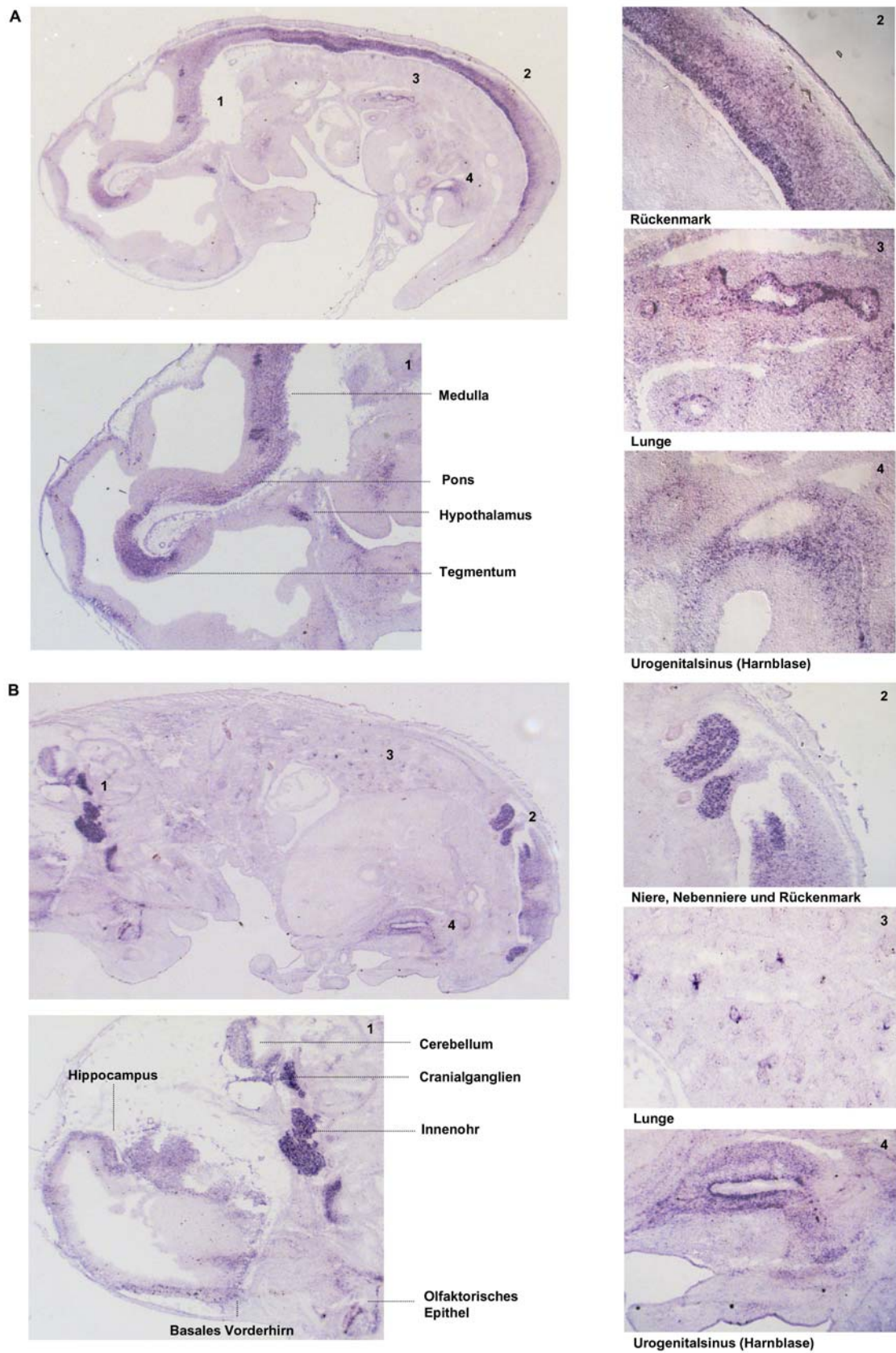


Abb. 22: In situ Hybridisierung von *Kcnb2* an transversalen murinen Embryonschnitten der Stadien 12,5 (A) und 14,5 (B). *Kcnb2* wird neuronal (A1,2, B1), pulmonal (A2, B2) und urogenital exprimiert (A3, B2,4).

#### 4.3.2 Kcnb2 Whole Mount In Situ Hybridisierung

Die eindeutige Aussage über die Beteiligung von *KCNB2* an der Chondro- bzw. Skeletogenese liess sich anhand von *in situ* Hybridisierungen an gesamten Extremitäten der Stadien 13,5 und 14,5, sowie an Gesamtembryonen des Stadiums 12,5 klären.

Abbildung 23 A zeigt deutlich, dass *Kcnb2* in embryonalen Extremitäten mit chondrogen sehr aktivem Gewebe nicht exprimiert wird. Das Ergebnis der transversalen Schnitte (s. Abb. 22 A) wurde bezüglich der neuronalen Expression (*Medulla spinalis, Cerebrum, Cranialganglien* etc. (s. Abb. 23 B oben weiße Pfeile)) reproduziert. Abbildung 23 B dokumentiert ausserdem bei fokussierten Extremitäten, dass *Kcnb2* wie in der Transversalen in Abbildung 23 A nicht exprimiert wird. Eine Beteiligung von *KCNB2* an der Chondrogenese, sowie an der Pathogenese der Brachydaktylie Typ E wurde ausgeschlossen.

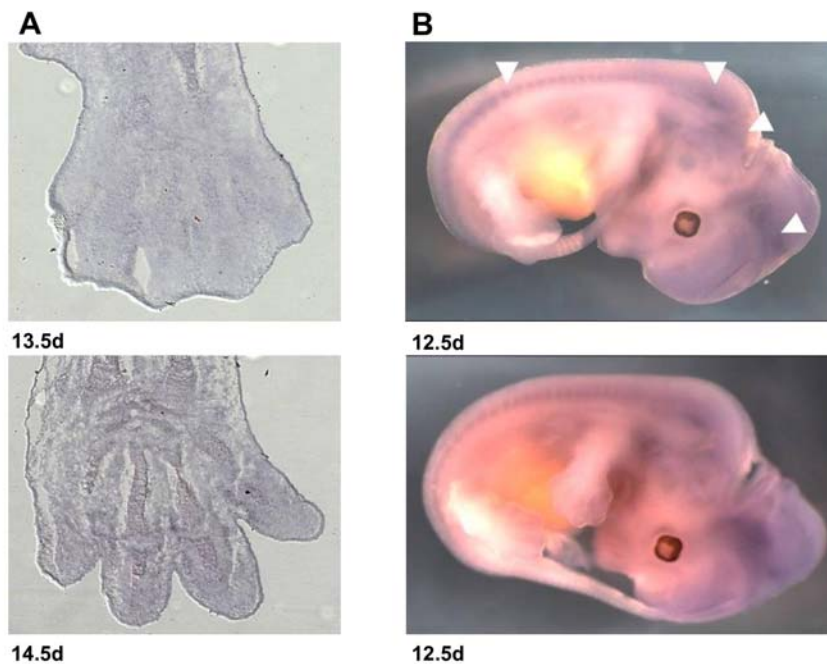


Abb. 23: A: *Kcnb2* in situ Hybridisierung an murinen Schnitten oberer Extremitäten der Stadien 13,5 und 14,5. B: Whole Mount in situ Hybridisierung an murinen Embryonen Stadium 12,5. Deutliche neuronale Expression in den whole mounts, wohingegen *Kcnb2* in Extremitäten nicht exprimiert wird.

## 4.4 Putative Fusionstranskripte und Kandidatengenexpression in murinen und humanen Chondrozyten, sowie Patientenfibroblasten

### 4.4.1 *PTHLH* – *KCNB2* Expression in Fibroblasten

Fibroblasten wurden aus Hautbiopsien der Personen III:2 und V:1 präpariert und in Kultur genommen. Die Untersuchung der *PTHLH* und *KCNB2* Expression in Passage 3 bis 5 sollte Aufschluss über eine potentielle Verwendung der Fibroblasten in weiteren Experimenten geben. Beide Gene werden in Fibroblasten schwach exprimiert (Daten nicht gezeigt, Primersequenzen s. 9.2). RT-PCR bzw. *Realtime* Produkte von *PTHLH* und *KCNB2* wurden durch Sequenzierung verifiziert.

Ausgehend von der Hypothese, dass *PTHLH* translokationsbedingt von cis-aktiven Regulatoren disloziert wurde, sollte die *PTHLH* Expression in unterschiedlichen Passagen von Fibroblasten un- und betroffener Personen quantifiziert werden. Aufgrund des nicht-chondrogenen Gewebes konnte kein *PTHLH* Expressionsunterschied gemessen werden. Die hypothetisch zugrundeliegende minimale *PTHLH* Fehlregulation war in dem vorhandenen Patientenmaterial nicht detektierbar (Daten nicht gezeigt).

### 4.4.2 Putative *PTHLH* – *KCNB2* Fusionstranskripte

Die *PTHLH* und *KCNB2* Expression stellte die Grundlage zur Untersuchung von putativen *PTHLH* – *KCNB2* Fusionstranskripten, da ausgehend vom vollständigen *KCNB2* Promotor über Exon 1 und 2 und den Ausschluß des *PTHLH* Promotors eine *PTHLH* Transkription stattfinden könnte. Anhang 9.2 zeigt die verwendeten Primerkombinationen, die Amplifikation von *KCNB2* und *PTHLH* jeweils auf dem unbetroffenen Allel diene als Positivkontrolle. Unterschiedliche Primerkombinationen, unter Verwendung der *KCNB2* Exons 1 und 2, sowie 4 *PTHLH* Exons, amplifizierten keine spezifischen Produkte. Die Existenz eines Fusionstranskriptes wurde somit ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt).

### 4.4.3 C28/I2 Zellwahl und die Expression knorpelspezifischer Marker in differenzierten ATDC5 Zellen

Patientenfibroblasten eigneten sich aufgrund zu gering exprimierten Kandidatengen nicht für weitere Experimente. Ausserdem repräsentieren sie weder embryonale, noch adulte Chondrozyten. Primäre Chondrozyten differenzieren nach 96 h in fibroblastenähnliche Zellen (persönliche Kommunikation M. B. Goldring, S. Stricker) und standen von BDE Patienten zudem nicht zur Verfügung.

Durch enge Zusammenarbeit mit Frau Professor M. B. Goldring (*Weill Cornell Medical College, Hospital for Special Surgery, New York City*), die große Expertisen auf dem Gebiet der Knorpelbiologie hat, entschieden wir uns für die Verwendung einer murinen und humanen Chondrozytenzelllinie. Reproduzierbare Ergebnisse sind möglich und der Status postnatalen Knorpels wird durch die humane Linie C28/I2 repräsentiert. Die embryonalen Chondrogenese-Regulatoren *IHH*, *PTH1H*, sowie die knorpelspezifischen Marker *Aggrecan*, *SOX9*, *COL2A1* und *COL10A1* werden exprimiert (Expressions-Chipdaten nicht gezeigt, persönliche Kommunikation M.B. Goldring).

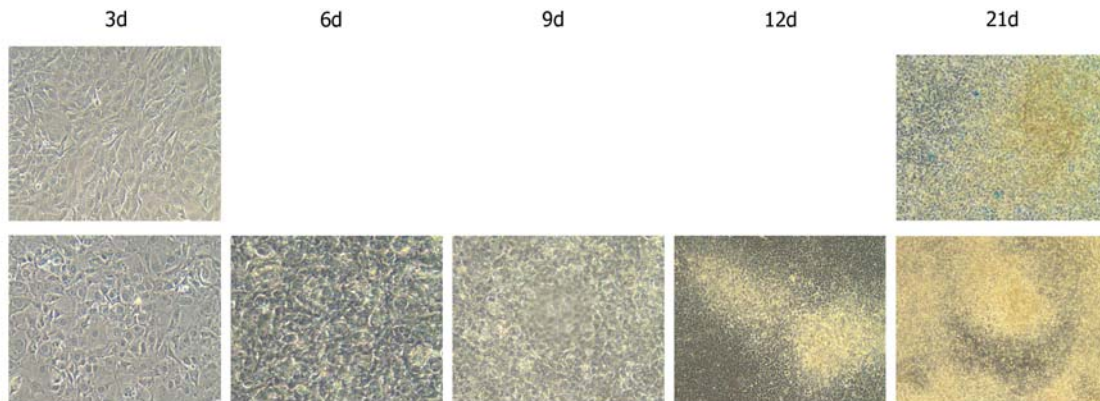
Die murinen, einem Terratokarzinom entstammenden ATDC5 Zellen können durch ITS (Insulin-Transferrin-Selenium) differenziert werden und zeigen innerhalb von 21 Tagen proliferative und hypertrophe Eigenschaften von Chondrozyten [243, 244]. Sie stellen ein geeignetes *in vitro* Modell für die murine Chondrogenese dar. Alzianblau (s. 3.1.1.4) färbte Proteoglycane der extrazellulären Matrix (ECM) und fibrillärer Kollagene in verschiedenen Stadien der ATDC5 Differenzierung (s. Abb. 24 A). Drei Tage differenzierte Zellen zeigten keine Produktion der extrazellulären Matrix, 21 Tage differenzierte Zellen waren morphologisch sehr klein und konfluent und zeigten neben der Expression von Kollagenen und ECM auch die deutliche Aggregatbildung mesenchymaler Kondensationen (*nodule formation*). Dies entspricht frühen chondrogenetischen Stadien der mesenchymalen Kondensationen [243, 244]. Die *nodule formation* war bereits ab Tag 8-9 zu beobachten (s. Abb. 23 A).

Die Quantifizierung der knorpelspezifischen Expressionsmarker *Col2a1*, *Col10a1*, sowie *Ihh* und *Pthlh* in 21 Tagen Differenzierung wurde durch quantitativ-kompetitive *Realtime*-PCR (QPCR) ermittelt (s. Abb. 24 B, Primersequenzen s. 9.5). Das Ergebnis entspricht der Darstellung unter 1.2.2 und 1.2.3. Die *Ihh* Expression stieg im Verlauf der Differenzierung an. Auch *in vivo* ist die *Ihh* Expression erst bei prä- und hypertrophen Chondrozyten deutlich verstärkt. *Pthlh* wurde in initialen und proliferierenden ATDC5 Zellen exprimiert und war im Mittel konstant. Ab Tag 14 der ATDC5 Differenzierung wurde die Expression reduziert.

Die Expression von *Col2a1*, dem Knorpelmarker für proliferierende Chondrozyten, wurde bis Tag 12 stark induziert und erreichte dann ein konstant stabiles Niveau, während *Col10a1*, der Marker für prä- und hypertrophe Chondrozyten weiter konstant anstieg. Kultivierung bzw. Differenzierung von ATDC5 Zellen von mehr als 21 Tagen entspricht nicht mehr einem chondrogenetischen *in vitro* Modell. Das Differenzierungsstadium von ATDC5 Zellen im Bezug auf die vier untersuchten Knorpelmarker zeigte am Tag 9 die signifikanteste Kinetik und eignete sich neben den humanen C28/I2 Zellen am besten für chondrogenetische *in vitro* Studien (s. Abb. 24 B).

**ATDC5 Nodule formation and ECM synthesis****A**

Undifferenzierte Zellen mit  
Alcianblau Färbung



ITS Differenzierung

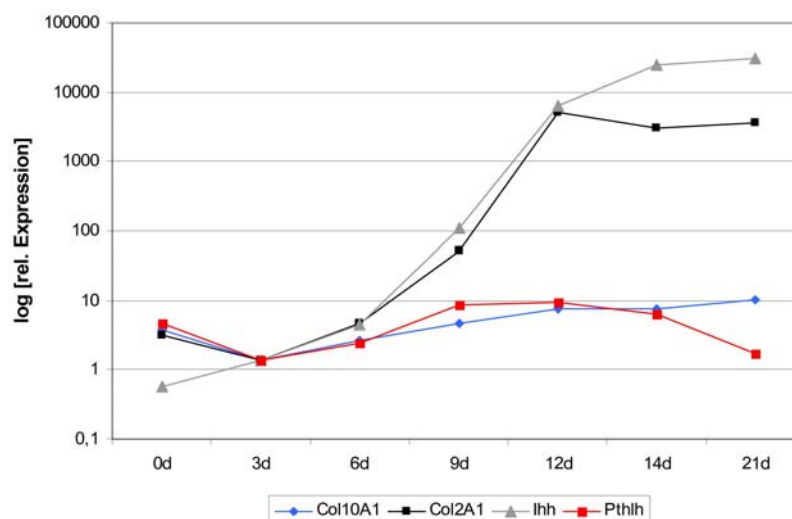
**B****Expressionsanalyse ATDC5 0-21d**

Abb. 24: A: Aggregatbildung mesenchymaler Kondensationen (Nodule formation) von ITS-differenzierten ATDC5 Zellen (0 – 21 Tage) und Alcianblau-Färbung an Tag 3 und 21. B: QPCR Expressionsanalyse in 21 Tagen Differenzierungszeit bei ATDC5 Zellen von Col2a1, Col10a1, Ihh und Pthlh.

#### 4.4.4 5' RACE PCR zur Bestimmung der *PTH LH* Promotorregion in murinen und humanen Chondrozyten

Die *PTH LH* Transkription wurde in Chondrozyten bislang unzureichend charakterisiert. Bekannt sind 2 TATA-Box Promotoren, sowie ein GC-reicher *PTH LH* Promotor [55, 56, 57, 58, 59]. Beide TATA-Box Promotoren und die *PTH LH* Exons sind in Mammalia stark konserviert, während der GC-reiche Promotor schon in der Maus unkonservierte Basen aufweist. In Bezug auf den gesamten *PTH LH* Promotor ist die Konservierung zwischen GC-reichem (2.) und TATA-Box Promotor (1.) am stärksten (s. Abb. 25).



Für funktionale Experimente und die Konstruktion eines *PTHLH* Promotor-Luziferase Plasmids war es erforderlich über 5' RACE (s. 3.5.5) das 5' Ende der *PTHLH* mRNAs und den *PTHLH* Transkriptionsstart (TSS) in murinen ATDC5 und humanen C28/I2 Zellen zu ermitteln.

Murine und humane Transkripte zeigten große Ähnlichkeiten. In C28/I2 Zellen startet die Transkription strangabwärts des GC-reichen Promotors am humanen Exon 3 an Position 28014179 bp (UCSC *Genome Browser* 2006). Die 5' RACE *PTHLH* Transkripte waren identisch mit den humanen *PTHLH* Transkripten NM\_198966, NM\_198964 und dem murinen Transkript NM\_008970 (NCBI *Accession Numbers*). Die Existenz weiterer *PTHLH* Spleißvarianten in anderen Geweben mit Exonverwendung 1 und 2 ist durch *Expressed Sequence Tags* (ESTs) und verifizierte *PTHLH* mRNAs im UCSC *Genome Browser* beschrieben. Humane Transkripte beinhalten Exon 4 und 5, während murine auch das homologe humane Intron 3 aufweisen (s. Abb. 25). Für funktionelle Reportergerassays wurde der Promotorbereich auf Chromosom 12 von 28013960-28017040 Mb (3080 bp) verwendet, da beide TATA-Box Promotoren, sowie der GC-reiche Promotor umfasst sind (s. 3.5. 18).

Desweiteren wurde der *PTHLH* Promotorbereich, als auch Leserahmen, bioinformatisch durch *zPicture* und *rVISTA* auf die am strangaufwärts gelegenen Bruchpunkt repräsentierten Transkriptionsfaktorbindungsstellen (TFBS) AP1 und ETS1, sowie auf NFκB untersucht (s. 3.2.4). Konservierte potentiell relevante AP1 TFBS für die *PTHLH* Regulation sind an Position 28010342, 28011215, ETS1 an 28016623 und NFκB an 28012534, 28016025 bp (s. Abb. 25).

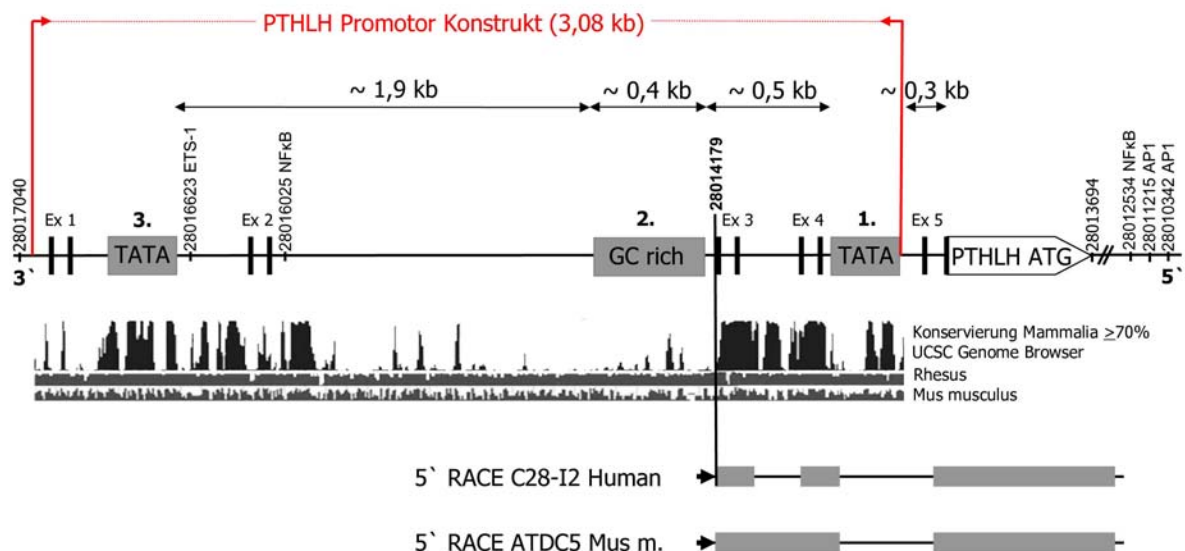


Abb. 25: 5' RACE von *PTHLH* Transkripten in ATDC5 und C28/I2 Zellen zur *PTHLH* Promotor Identifikation. *PTHLH* liegt auf dem antisense Strang (-). Murine und humane *PTHLH* Transkripte starten strangaufwärts des GC-reichen Promotors (2.). Genomische Distanzen zwischen den Promotoren sind in kb angegeben. TFBS von AP1, ETS1 und NFκB wurden bioinformatisch detektiert und sind mit genomischer Position gekennzeichnet. Der Bereich von 28013960-28017040 bp ist Grundlage für Reportergergenkonstrukte. Starke Konservierung liegt im Bereich der Exons, sowie bei beiden TATA-Box Promotoren (1., 3.) vor, während der GC-reiche Promotor nur im Rhesus Affen voll konserviert ist; Ex1 = *PTHLH* Exon 1; ATG = Translationsstart; TSS *PTHLH* 28014179 bp.

## 4.5 Nachweis der cis-aktiven *PTHLH* Regulatorfunktion von Bruchpunkt der(8)

### 4.5.1 Chromatin Immunopräzipitation (ChIP) zur Untersuchung der Histonmodifikation

Der experimentelle Nachweis von Histonmodifikationen durch Chromatin Immunopräzipitationen (ChIP) kann als Marker für den Aktivierungszustand des Chromatins genutzt werden. In Zellkultur können durch Formaldehyd DNA-bindende Proteine, wie Transkriptionsfaktoren und Histone, an der DNA fixiert und im Weiteren durch molekulargenetische Methoden wie QPCR oder ChIP Chip Experimente die genomische Region detailliert untersucht werden. Vorteil dieser DNA-Protein-Fixierung (*Crosslinking*) ist, dass Chromatinschleifen (*loops*) als regulatorische Charakteristika, vornehmlich während der Interphase, die auf cis-aktiven genomischen Regulatoren mit assoziierten DNA-bindenden Interaktionspartnern und den zugehörigen Promotorbereichen des zu regulierenden Gens beruhen, untersucht werden können.

Mehr als 60 Histonmodifikationen sind bekannt. Dreifach methyliertes Lysin an Position 4 von Histon 3 (H3K4me3) ist bisher an aktiven Promotoren stark angereichert aufgefunden worden [197]. H3K4me1 ist mit Euchromatin an cis-aktiven *Enhancern*, H3K9me3 und H3K27me3 mit Heterochromatin an cis-gelegenen *Silencern* assoziiert worden [190, 192, 197, 200, 201, 202].

Basierend auf bisherigen Ergebnissen sollte die putative Rolle der Bruchpunkte auf der(12) und der(8) in Verbindung mit der *PTHLH* Regulation in Chondrozyten untersucht werden. Es stellte sich die Frage, ob die genomische Neuordnung einer Translokation auch Einfluss auf epigenetische Mechanismen hat und sich Histonmodifikationen im Bereich der Bruchpunkte verändern.

Die murine und humane Region in undifferenzierten ATDC5, ATDC5 9d und C28/I2 Zellen um die 1. TATA-Box, sowie um den *PTHLH* Transkriptionsstart stellten I. die Positivkontrolle für erfolgreiche ChIP Experimente dar, II. verifizierten sie die RACE Daten (s. 4.4.4), III. konnten bisher publizierte Ergebnisse von angereicherten Histonmodifikationen an aktiven Promotoren bestätigt werden. Präzipitiertes Chromatin wurde vor spezifischen Amplifikationen der Bruchpunkte der(8) und der(12), sowie des *PTHLH* Promotors durch Negativ- und Positivkontrollen auf die Bindungsspezifität des jeweiligen Antikörpers untersucht. Primer sind Anhang 9.6 zu entnehmen.

Abbildungen 26 A und B zeigen eindeutig eine Anreicherung von H3K4me3 an der 1. *PTHLH* TATA-Box, sowie am *PTHLH* Transkriptionsstart in ATDC5, ATDC5 9d und C28/I2 Zellen

gegenüber der *input*-Probe. H3K4me1, H3K9me3 und H3K27me3 sind nicht signifikant angereichert.

Bisher publizierte Erkenntnisse zu H3K4me3 werden somit verifiziert, die erfolgreiche ChIP ist eindeutig. Des Weiteren entspricht dieser Bereich den RACE Daten und ist somit der chondrogen transkriptionsaktive *PTH1H* Promotorbereich (s. Abb. 25). Allgemein wurde während der ChIP Experimente deutlich, dass die Präparation von ATDC5 U Zellen immer qualitativ hochwertiger war, als die der ATDC5 9d und C28/I2 Zellen. Grund mag die verstärkte Bildung extrazellulärer Matrix sein. In humanen C28/I2 Zellen wurde deshalb keine signifikante Anreicherung der untersuchten Histone gefunden (s. Abb. 26 C).

Die Bruchpunktregion auf Chromosom 12 wurde murin (homologe Region auf Chromosom 6) und human untersucht. H3K4me1, bisher potentiell mit *Enhancer*-Funktionen assoziiert, war in ATDC5 und ATDC5 9d Zellen gegenüber dem *input* signifikant angereichert und identifizierte die Bruchpunktregion strangaufwärts von *PTH1H* als putativen Regulator. H3K4me3 und H3K9me3 waren signifikant angereichert, allerdings geringer als H3K4me1, wohingegen H3K27me3 nicht angereichert war (s. Abb. 26 C). Die Kinetik von signifikanten Histonanreicherungen im Vergleich untereinander war auch bei den unterschiedlichen Zelllinien weitgehend identisch. Es ist davon auszugehen, dass es unter den Mammalia keine signifikanten Unterschiede bezüglich H3K4me3 und H3K9me3 an der Bruchpunktregion von Chromosom 12 gibt.

Der Bruchpunktbereich auf Chromosom 8 konnte nur in C28/I2 Zellen untersucht werden, da die homologe murine Region nicht existent ist. Gegenüber der *input*-Probe wurde keine Anreicherung der untersuchten Histone nachgewiesen (s. Abb. 26 D). Die Amplifikation der ChIP an der Chromosom 8 Bruchpunktregion diente bei allen C28/I2 ChIP als Negativkontrolle.

Die eindeutigen Ergebnisse der immortalisierten Chondrozyten sollte an den *PTH1H*-exprimierenden primären Patientenfibroblasten (s. 4.4.1) nachvollzogen werden. Die Fibroblasten wurden ausschließlich bis Passage 4 kultiviert. Aufgrund der geringen Chromatinmenge (~ 2 µg Chromatin) und den ChIP Ergebnissen an murinen und humanen Chondrozyten wurde nur die Qualität der Fibroblasten-ChIP überprüft und anhand der bisher aussagekräftigsten Histonmodifikationen H3K4me1 und H3K4me3 die der(8) Bruchpunktregion im Vergleich zum Wildtypallel auf Chromosom 12 amplifiziert.

H3K4me1 war an der(8) und am unbetroffenen Chromosom 12 angereichert, wobei an der(8) im Vergleich zu Chromosom 12 die Anreicherung doppelt so stark war (s. Abb. 26 E). H3K4me3 war nur an der(8) signifikant angereichert. Die Kinetik der Ergebnisse war nahezu identisch zu den ChIP an ATDC5 und C28/I2 Zellen.



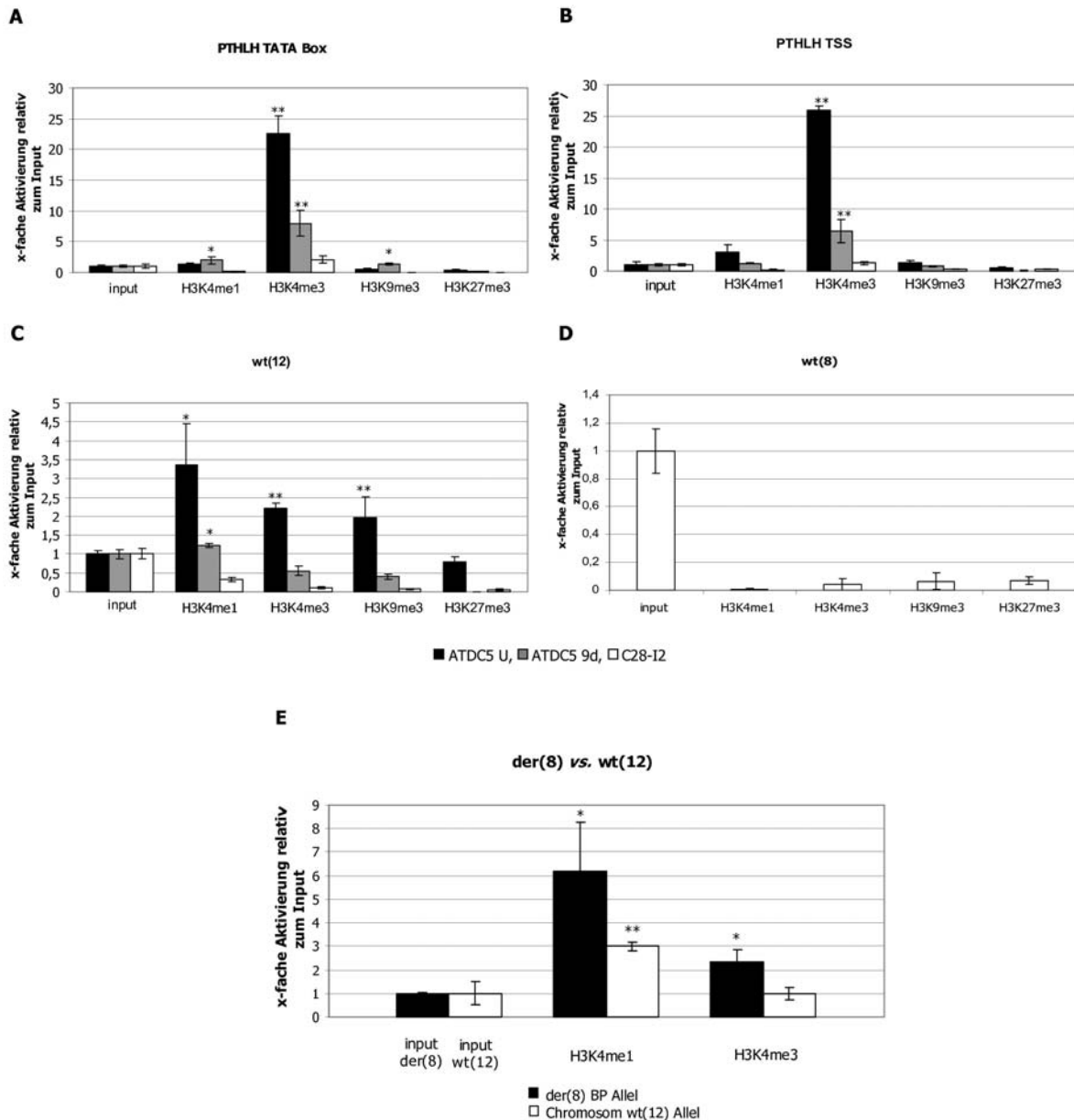


Abb. 26: ChIP Experimente an ATDC5, ATDC 9d, C28/I2 Zellen (A-D) und Patientenfibroblasten (E) mit Antikörpern gegen H3K4me1, H3K4me3, H3K9me3 und H3K27me3 Histonmodifikationen. Die proximale PTHLH TATA-Box, der PTHLH Transkriptionsstart (TSS) dienen als Positiv- (A, B), wt(8) an Bruchpunkt (BP) Position in C28/I2 Zellen als Negativkontrolle (D). C: Histonmodifikationen am BP auf humanem Chromosom 12 (C28/I2), murines Chromosom 6 (ATDC5); D: Vergleich von H3K4me1 und H3K4me3 an der(8) BP- und Wildtyp-Allel 12 BP Region an Fibroblasten betroffener Patienten.

#### 4.5.2 Reporterassays zur Evaluierung der cis-aktiven Bruchpunktsequenz

Die ChIP Ergebnisse zeigten transkriptionell aktives Euchromatin an BP der(8). In Luziferase Reporterassays mit dem spezifischen *PTHLH* Promotor (s. 5' RACE Daten 4.4.4) sollte die regulatorische Aktivität der Bruchpunkt-TFBS von AP1 und ETS1 in ATDC5 und

C28/I2 Chondrozyten ermittelt werden. Die unmittelbaren Bruchpunktsequenzen auf Wildtyp-Chromosom 8 und 12 (wt(8), wt(12)) und der(8) Bruchpunkt, sowie eine jeweilige dreifache Sequenzwiederholung wurde der genomischen Orientierung entsprechend strangaufwärts des *PTHLH* Promotors in den Luziferase-Reportervektor pGL2 *basic* kloniert (s. Abb. 27 oben, s. 3.5.18, Oligonukleotide s. 9.4). Abzüglich der im Luminometer gemessenen Hintergrund-Lumineszenz wurden alle Werte als x-fache Aktivierung in Bezug auf den *PTHLH* Promotor dargestellt.

Die wt(8) Sequenz mit einer Kernkonsensussequenz für ETS1 aktivierte minimal die Transkription des *PTHLH* Promotors. Eine signifikante Steigerung bei Sequenzwiederholung war nicht zu beobachten, wohingegen die AP1 TFBS auf wt(12) und wt(12)x3 die *PTHLH* Transkription stark aktivierte. Die der(8) Bruchpunktsequenz führte in C28/I2 Zellen zu einer dreifachen Aktivierung, wobei der(8)x3 reprimierend wirkte, bzw. keinen Effekt zeigte (s. Abb. 27). Die Interaktion von AP1 und ETS Transkriptionsfaktoren an der(8) BP aktivierte die *PTHLH* Transkription, allerdings hatte die Sequenzwiederholung beider Bindungsmotive nicht dieselben Auswirkungen wie die dreifache AP1 Sequenz bei wt(12)x3. Die *PTHLH* Transkription wurde bei vorhandener ETS1 Kernkonsensussequenz deutlich reprimiert.

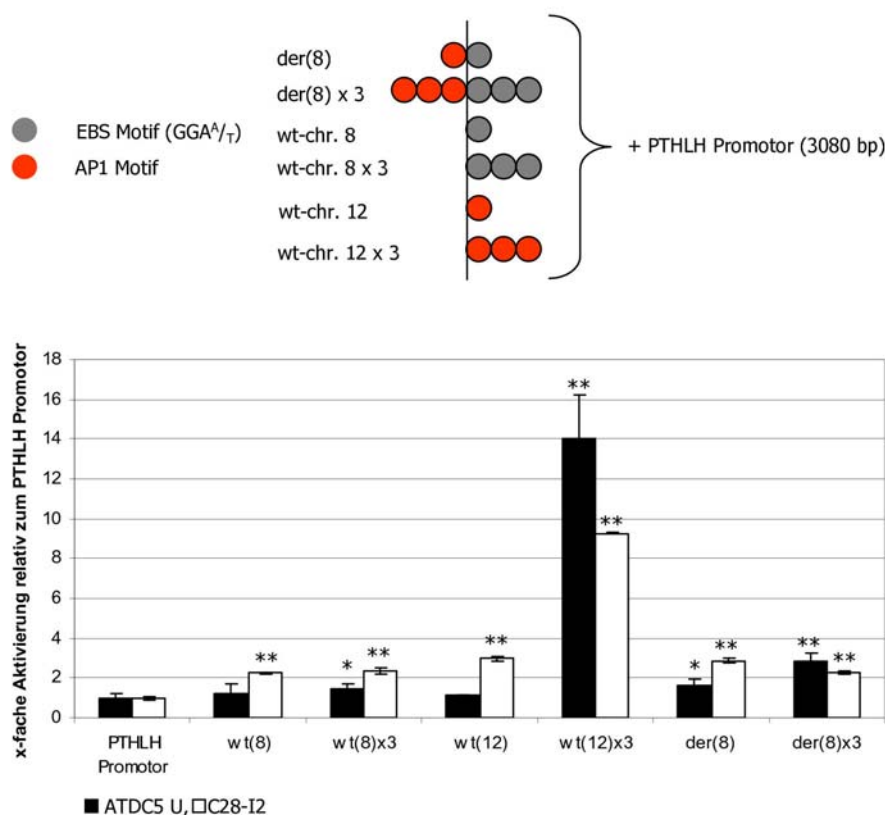


Abb. 27: Reportergenassays mit ATDC5 und C28/I2 Zellen. Die x-fache Aktivierung des Regulator-PTHLH-Promotor-Luziferaseplasmids ist in Bezug zur Transkription des PTHLH Promotors gesetzt. Wt(8) (ETS1 Motiv) und wt(12) (AP1 Motiv) repräsentierten die Wildtypsequenz am Bruchpunkt auf den Chromosomen 8 und 12, der(8) die Bruchpunktsequenz mit AP1 und ETS1 Motiven. Eine jeweilige dreifache Sequenzwiederholung wurde zusätzlich getestet (wt(8)x3, wt(12)x3, der(8)x3). Aufbau der Reportergenkonstrukte s. o.

#### 4.5.3 c-jun und C-ets-1 Interaktion mit den Bruchpunktsequenzen im EMSA

Aufgrund der ChIP-Ergebnisse und den *in silico* identifizierten TFBS für AP1 und ETS1, die im Reporterassay eine *PTH LH* Transkriptionsaktivierung zeigten (s. 4.2.4, 4.5.1, 4.5.2), sollte untersucht werden, ob rekombinantes humanes AP1 (c-jun) und C-ets-1 im *Elektro Mobility Shift Assay* (EMSA) an die Bruchpunktsequenz von der(8) und an die Wildtypsequenz auf Chromosom 12 bzw. 8 binden. Die Oligos der AP1 und ETS1 Kontrolle sind Anhang 9.7 zu entnehmen.

c-jun band aufgrund der Konsensussequenz –TGAGTCA– an der(8) und der Wildtypsequenz auf Chromosom 12 (s. Abb. 28 A Lane 5, 8). C-ets-1 band auch an der(8) und aufgrund der vorhandenen Kernkonsensussequenz –GGA<sup>A</sup>/T– an der Wildtypsequenz auf Chromosom 8, was somit als weitere Positivkontrolle dient (s. Abb. 28 B Lane 5, 11). C-jun bund wie erwartet nicht an wt(8) (s. Abb. 28 A Lane 11), C-ets-1 nicht an wt(12) (s. Abb. 28 B Lane 8).

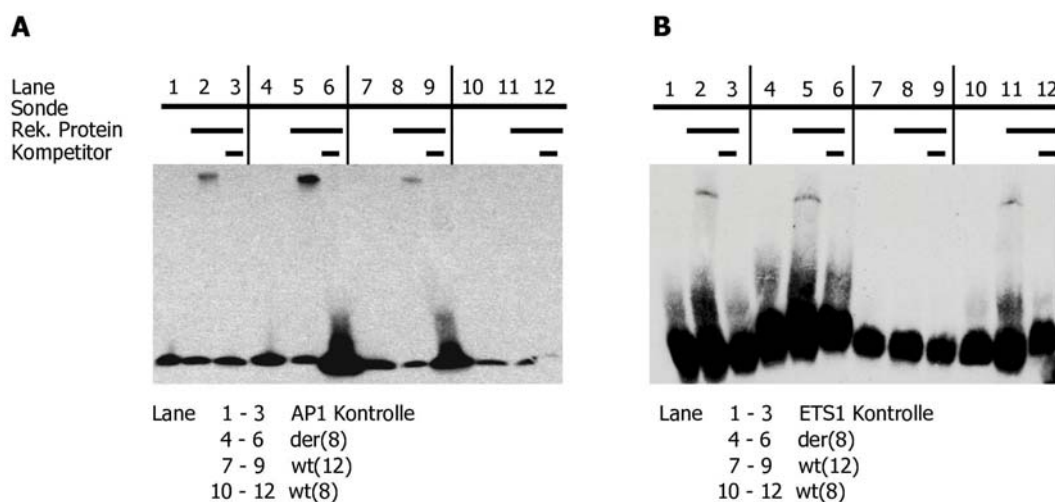


Abb. 28: EMSAs mit humanem rekombinanten AP1 (c-jun) (A) und C-ets-1 (B). 3' Biotinmarkierte Sonde als doppelsträngiges Oligo in Lane 1-12, rhAP1 bzw. rhC-ets-1 in Lane 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10 und 12, unmarkiertes Kompetitionsoligo in Lane 3, 6, 9 und 12.

#### 4.5.4 c-jun, C-ets-1 und PTHrP Detektion auf Proteinebene nach PMA Stimulation in ATDC5 und C28/I2 Zellen

Die Tumor-induzierende Substanz Phorbol 12-Myristat 13-Azetat (PMA) ist bekannt dafür, AP1- und ETS-Transkriptionsfaktoren stimulieren zu können [245, 246, 247, 248]. Außerdem kann NFκB über die Proteinkinase C aktiviert werden [249].

Die putative *PTH LH* Regulation wurde durch *Westernblotting* an PMA-stimulierten ATDC5 und C28/I2 Zellen untersucht. Die PMA Stimulation und Hochregulation von AP1 (c-jun) und C-ets-1 wurde nach 4, 8 und 24 h gezeigt. Eine deutliche Expressionssteigerung war während des Zeitverlaufs bei c-jun und C-ets-1 in beiden Spezies zu beobachten (s. Abb. 29 A). Von

einer  $\beta$ -Aktin-Ladekontrolle wurde bei PMA-stimulierten Zellen bisher Gegenzugliches bezüglich Modifizierungen des Zytoskeletts berichtet. Die Verwendung eines  $\beta$ -Aktin Antikörpers machte in Chondrozyten deutlich, dass trotz exakter Bradford-Proteinbestimmung keine identische Aktinmenge detektiert werden kann. Die Hypothese ging von agglutinierten Aktinkomplexen aus, die durch Zentrifugationsschritte bei der Gesamtproteinpräparation verloren gehen (Daten hier nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde die Ladekontrolle mit dem eukaryotischen Initiationsfaktor 4E (eIF-4E) durchgeführt. Die Expression von PTHrP (*Parathyroid hormone related peptide or protein*) wurde durch PMA in ATDC5, C28/I2 Zellen und Fibroblasten von Kontrollproband, als auch BDE Patient, hochreguliert (s. Abb. 29 A, D). Die Signalstärke der einzelnen Banden wurde durch den eIF-4E Standard quantifiziert und zeigt Signifikanz (s. Abb. 29 B, C). PTHrP in C28/I2 Zellen zeigte nach 24 h PMA Stimulation eine 3,5 fache, in ATDC5 Zellen eine 1,5 fache Aktivierung gegenüber unstimulierten Zellen.

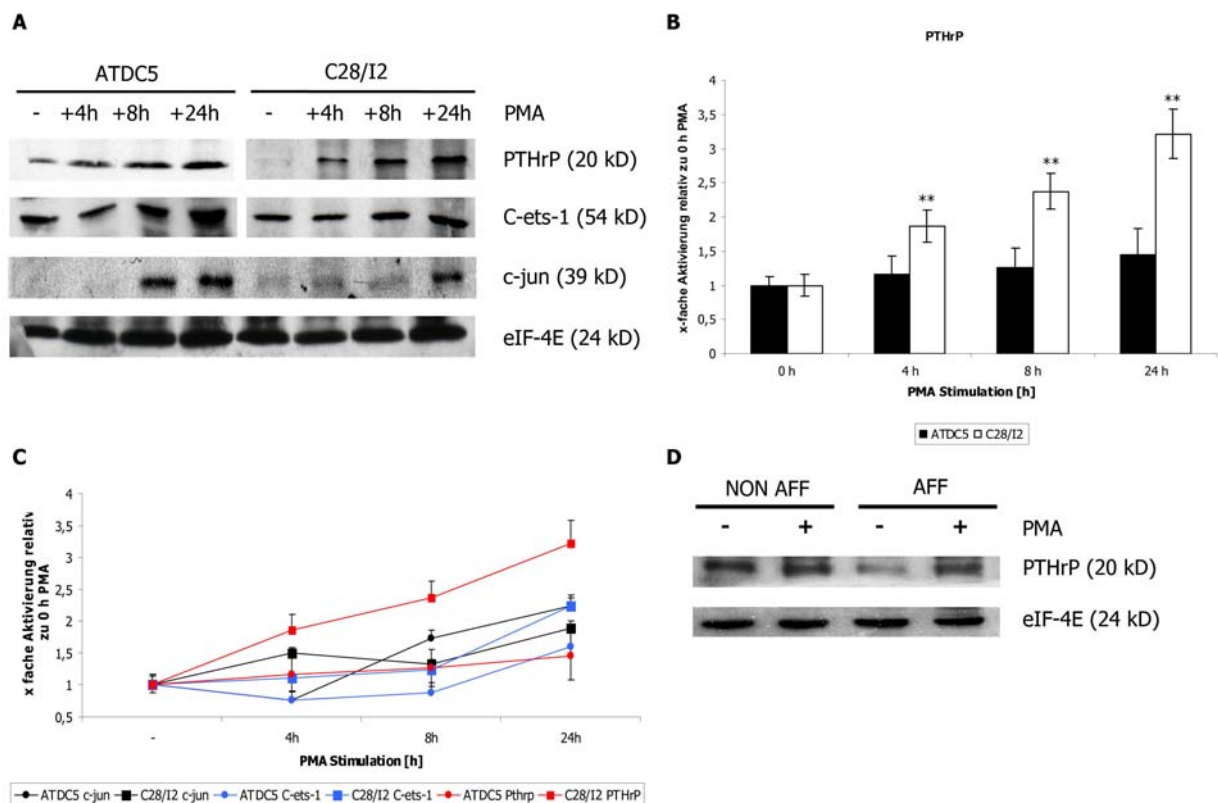


Abb. 29: Westernblotting an Proteinextrakten von PMA-stimulierten ATDC5 und C28/I2 Zellen nach 0, 4, 8 und 24 h zur c-jun-, C-ets-1-Detektion und PTHrP Quantifizierung. C-jun, C-ets-1 und PTHrP wurden durch PMA stimuliert und ihre Expression hochreguliert (A). Die PTHrP Expression wurde signifikant hochreguliert (B) PTHrP Quantifizierung, (C) PTHrP, c-jun und C-ets-1 Quantifizierung in ATDC5 und C28/I2 Zellen durch eIF-4E Expression als Standard (n = 4), (D) PTHrP Expression in Fibroblasten eines Kontrollprobanden (NON AFF) und BDE Patienten (AFF) vor (-) und nach (+) PMA Stimulation (48 h).

#### 4.5.5 PMA-unabhängige PTHrP-Aktivierung durch Überexpression von transfizierten *JUN*, *JUNB*, *FOS* und *ETS1*

Die Ergebnisse der PMA Stimulation an ATDC5 und C28/I2 sollten durch Überexpression unterschiedlicher *ETS1* / AP1 Kombinationen (*c-JUN*, *JUNB*, *FOS*) reproduziert werden. Ausserdem sollte der generelle Effekt einer PMA Stimulation bezüglich anderer Transkriptionsfaktoren ausgeschlossen werden und spezifisch der Effekt von AP1 / C-ets-1 auf *PTHrP* untersucht werden. Die Interaktion von AP1 Heterodimeren mit C-ets-1 ist bekannt [250, 251] .

C28/I2 Zellen eigneten sich besser als ATDC5 Zellen, aufgrund der signifikanteren PTHrP-Expression während der PMA Stimulation (s. Abb. 29).  $1,5 \times 10^6$  Zellen wurden für 72 h mit jeweils 22,5 µg Expressionsplasmid transfiziert, geerntet und *Westernblotting* durchgeführt. Bei einzelnen Expressionsplasmiden wurde wie bei der Kontrolle mit pcDNA3.1 Leervektor auf 22,5 µg DNA komplettiert. Ein Vergleich zwischen Kontrolle und nichttransfizierten C28/I2 Zellen wurde angestellt, ergab allerdings keine signifikanten Unterschiede in der Expression von AP1-Faktoren, C-ets-1 und PTHrP (Daten nicht gezeigt). Ladekontrolle war  $\beta$ -Aktin (s. Abb. 30 A unten).

Der C-ets-1 Antikörper detektierte die 54 kD große Isoform, bund relativ unspezifisch und generierte schwache Signale. Im Vergleich zur Kontrolle in *Lane 1* war in den *ETS1*-transfizierten Zellen (s. Abb. 30 A *ETS1 Lane 2*, 7-10) eine höhere Expression zu beobachten. Die verstärkte Expression von C-ets-1 in AP1-transfizierten Zellen (*Lane 2-6*) ist durch die AP1-vermittelte Aktivierung des *ETS1*-Promotors zu erklären [252] . Ähnliche Ergebnisse waren bei den AP1-Faktoren zu beobachten. *JUNB* wird durch *ETS1* reguliert [253] . Eine durch C-ets-1 induzierte höhere *jun-B*-Expression zeigte sich dementsprechend (s. Abb. 30 A *Lane 2* und 7-10).

Die äußerst spezifischen Antikörper gegen *c-jun* und *c-fos* detektierten die Isoformen in den entsprechend transfizierten Zellen (s. Abb. 30 A *JUN Lane 3*, 6, 7, 9, 10 und *FOS Lane 5*, 10). Bezüglich *c-fos* ist bekannt, dass es *c-JUN* und möglicherweise auch *JUNB* transaktiviert, wodurch die verstärkte Expression in *c-JUN* und *JUNB* transfizierten Zellen zu erklären ist (s. Abb. 30 A *c-FOS Lane 3*, 4, 6-9) [254, 255] . Kreuzreaktivitäten zwischen Mitgliedern der AP1-Familie sind aufgrund hoher Homologie, selbst bei den Antikörperbindungsdomänen, nicht auszuschließen. Im Vergleich zur pcDNA3.1-Kontrolle (s. Abb. 30 A *Lane 1*) war in jedem Versuch eine erhöhte Expression des transfizierten Gens nachweisbar.

*PTHrP* wurde wie bei der PMA Stimulation durch AP1 und C-ets-1 hochreguliert. Die PTHrP-Expression wurde minimal durch C-ets-1 und *c-jun* stimuliert, wohingegen die Kombination aus beiden und *c-jun* mit *jun-B* stark aktivierend war (s. Abb. 20 A PTHrP *Lane 6-7*). *Jun-B* und *c-fos* in *Lane 4* und 5 induzierten die PTHrP-Expression stärker als *c-jun* (*Lane 3*).

Die Kombination aus C-ets-1 mit jun-B und die Heterodimere aus c-jun / jun-B oder c-jun / c-fos mit C-ets-1 zeigten die stärkste Transaktivierung von PTHrP (s. Abb. 30 A PTHrP Lane 8-10). Die Quantifizierung der AP1 / *ETS1* induzierten PTHrP-Expression durch den  $\beta$ -Aktin Standard ist Abbildung 30 B zu entnehmen. Signifikante Daten sind markiert und bestätigen, dass AP1 Faktoren, vornehmlich jun-B und c-fos mit C-ets-1, *PTHrP* transaktivatorisch in postnatalen humanen Chondrozyten positiv regulieren.

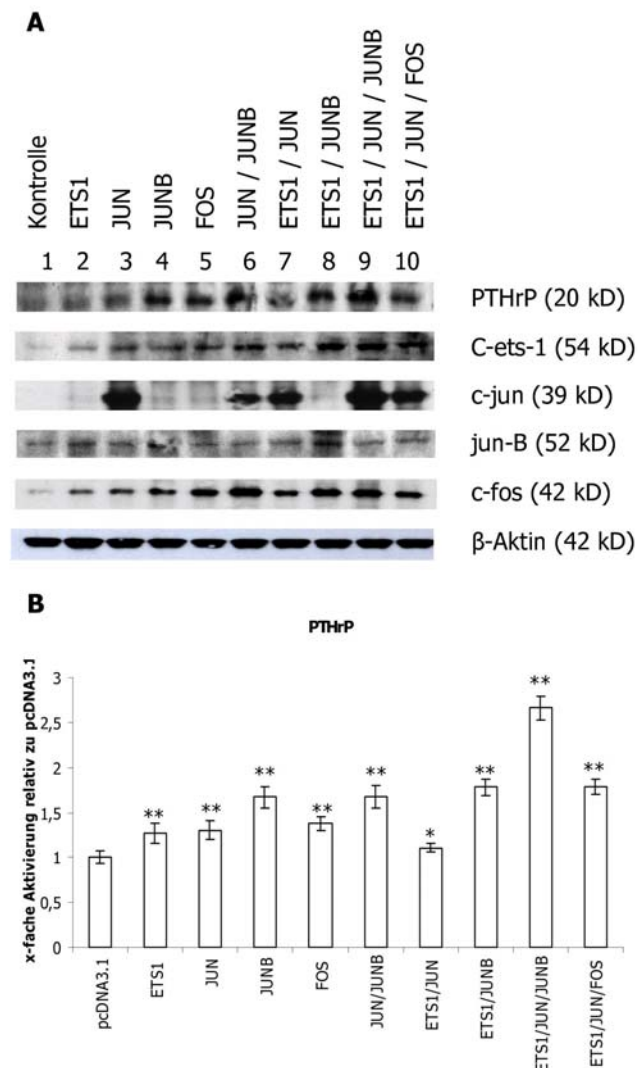
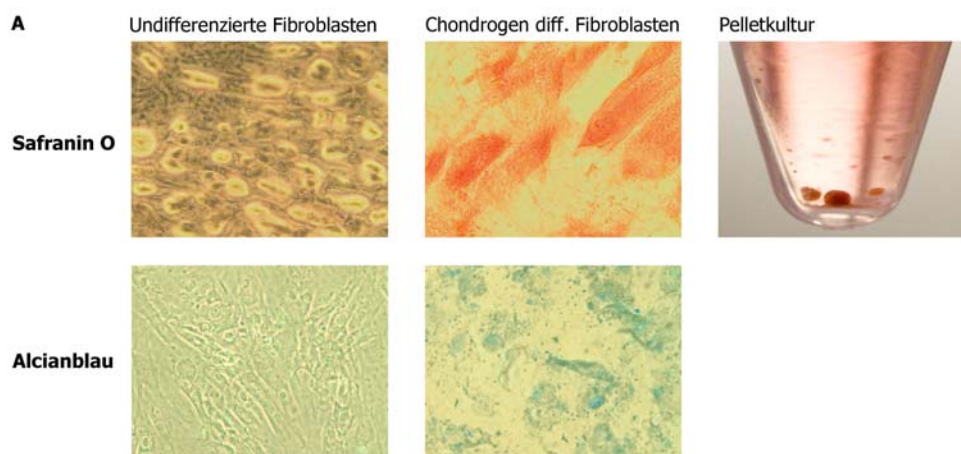


Abb. 30: Westernblotting an C28/I2 Zellen, transfiziert für 72 h mit unterschiedlichen Kombinationen von AP1- (c-JUN, JUNB, FOS) und ETS1-Expressionsplasmiden (A Lane 1-10). c-jun, jun-B, c-fos, C-ets-1 und PTHrP Detektion zur Überprüfung der Transfektion und Expression; Ladekontrolle durch  $\beta$ -Aktin. (B) PTHrP Detektion und Quantifizierung über  $\beta$ -Aktin Standard (n = 5). PTHrP wurde durch Kombinationen aus C-ets-1 mit c-jun / jun-B oder c-jun / c-fos am stärksten hochreguliert.

#### 4.5.6 *PTHLH* Quantifizierung in chondrogen induzierten Fibroblasten

Die *PTHLH* Quantifizierung durch QPCR in Fibroblasten betroffener BDE Patienten und Kontrollpersonen zeigte keinen Unterschied. Es wurde versucht Fibroblasten durch Protokolle für chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen (MSC) und dermalen Fibroblasten chondrogen zu induzieren [209, 256, 257] , um anhand dieses Patientenmaterials die hypothetische gewebespezifische *PTHLH* Fehlregulation zu detektieren. Die Fibroblasten wurden in DMEM Medium, ergänzt durch *Insulin growth factor 1* (IGF1), *Transforming growth factor  $\beta$  1* (TGF- $\beta$ -1), Insulin, Transferrin, Selenium und 10 % *Fetal Calf Serum* (FCS), als Pelletkultur für vier Wochen kultiviert. Das Expressionsmuster für *Aggrecan*, *COL2A1*, *IHH* und *PTHLH* wurde durch QPCR analysiert und eine Alzianblau- bzw. Safranin O-färbung bestätigten die chondrogene Differenzierung (Primer s. 9.5). Abbildung 31 A zeigt, dass Proteoglycane in der ECM durch Alzianblau und Safranin O angefärbt wurden. *Aggrecan* und *COL2A1* als Marker für proliferative Chondrozyten wurden signifikant hochreguliert. Damit stand ein patientenspezifisches *in vitro* Modellsystem zur Verfügung, um den Einfluss der Translokation auf die *PTHLH* Regulation in Chondrozyten zu verifizieren. *PTHLH* wurde bei Kontrollpersonen in chondrogen differenzierten Fibroblasten im Vergleich zu undifferenzierten Fibroblasten hochreguliert, dagegen war zwischen chondrogenen und undifferenzierten Fibroblasten des BDE Patienten keine entsprechende Expressionssteigerung von *PTHLH* nachweisbar. Im Vergleich zu den chondrogen differenzierten Fibroblasten der Kontrollpersonen, ist die *PTHLH* Expression in chondrogen differenzierten Fibroblasten des Patienten signifikant reduziert. *IHH* wurde in chondrogen differenzierten Fibroblasten des BDE Patienten signifikant höher exprimiert als in Kontrollprobanden (s. Abb. 31 B).



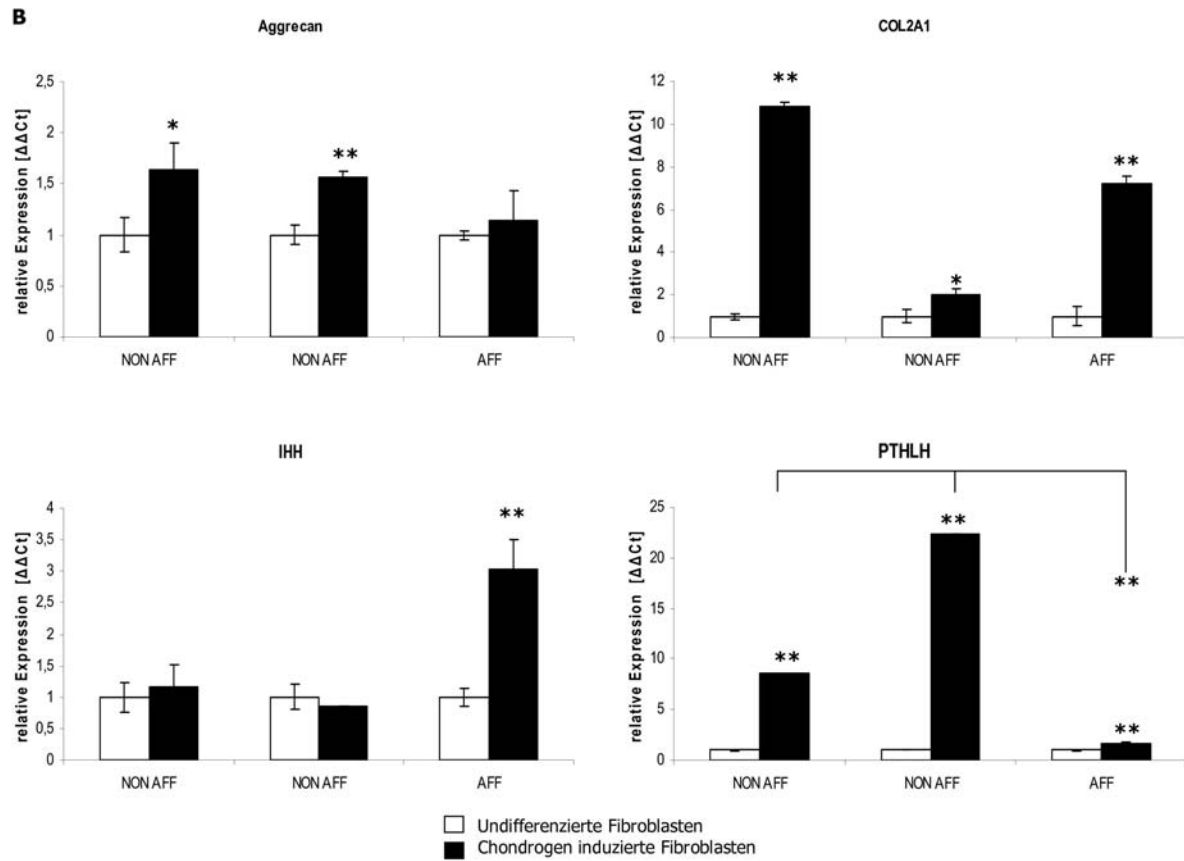


Abb. 31: PTHLH und IHH Fehlregulation in chondrogen induzierten Fibroblasten. (A) Alzianblau und Safranin O Färbung der Proteoglycane in un- und chondrogen differenzierten Fibroblasten; Beispiel für differenzierte Fibroblasten in Pelletkultur. (B) QPCR Analysen zwischen Fibroblasten und chondrogen induzierten Fibroblasten mit Aggrecan, COL2A1, IHH und PTHLH. NON AFF = Kontrollpersonen, AFF = BDE Patient; PTHLH wird im BDE Patient trotz chondrogener Induktion signifikant inhibiert, IHH signifikant aktiviert.



## 5. Diskussion

Die Chondrogenese umfasst eine Vielzahl komplexer Prozesse [238], die zeitlich und räumlich getrennt, aufgrund von feinregulierten Signalmolekülen ablaufen und deren weiterer Erforschung es bedarf. Die Entwicklung des Skeletts beginnt mit mesenchymalen Kondensationen im Embryonalstadium [6] und endet mit dem Abschluss der enchondralen Ossifikation am Ende der Pubertät [1]. Die Regulation der proliferativen und hypertrophen Chondrozyten ist essentiell für die Knochenform und -größe [54]. Mutationen, derivative Konzentrationsgradienten von sezernierten Signaltransduktoren, sowie Veränderungen der cis-regulierten Transkriptionseigenschaften chondrogenetisch aktiver Gene führen zu Chondrodysplasien [4, 93, 94, 96, 100].

Einige monogene Ursachen unterschiedlicher Brachydaktylien sind bisher aufgeklärt [50, 93, 101, 102, 103, 106, 107, 108, 110, 115, 116]. Es existieren Tiermodelle mit Brachydaktylie-ähnlichen Phänotypen, die auf experimentellen Ergebnissen zu den fundamentalen Chondrogeneseregulatoren Pthrp, Ihh und Shh (*Sonic hedgehog*) basieren [68, 104, 125, 126, 127, 258, 259, 260].

Aufgrund bisheriger Erkenntnisse des die Proliferationsrate der Chondrozyten regulierenden PTHrP, stellt die Translokation t(8;12)(q13;p11.2) mit dem zu *PTHLH* strangaufwärts gelegenen Bruchpunkt auf dem derivativen Chromosom 8 die Grundlage für eine Studie zur Charakterisierung hochkonservierter intergenischer Sequenz mit putativen Transkriptionsfaktorbindungsstellen. Anhand der Ergebnisse dieser Dissertation ist es möglich die chondrogenetische *PTHLH* Dysregulation in Bezug auf die molekulare Pathogenese der Brachydaktylie Typ E zu erklären.

### Charakterisierung des Genotyps

Die molekulare Lokalisation und Charakterisierung genomischer Bruchpunkte ist essentiell, da die genomische Region hochkonserviert sein und cis-regulatorische Elemente (CRE) beinhalten kann, die die Expression benachbarter Gene steuern [160]. Positionseffekte mit genregulatorischem Einfluss zeigen embryogenetisch hohe Relevanz und unterstreichen die Bedeutung, Bruchpunkte zu charakterisieren und cis-gesteuerte intergenische Regulationen gewebespezifisch zu erforschen [85, 185, 187, 188, 189].

Die Karyotypisierung der Indexpatientin (IV:2) wies eine apparente Translokation zwischen Chromosom 8 und 12 auf. YAC und BAC Hybridisierungen in Metaphase-FISH Experimenten mit BAC RP11-1151B7 für den p-Arm von Chromosom 12 und BAC RP11-313C5 für den q-Arm von Chromosom 8 lokalisierten die Translokation t(8;12)(q13;p11.2) cytogenetisch.

Aufgrund der Metaphase-FISH Auflösungsgrenze war es erforderlich über *Southernblotting* die kritische Bruchpunktregion einzuschränken, um durch allelspezifische Amplifikation die Subklonierung für anschliessendes Sequenzieren vornehmen zu können. Der Bruchpunkt (BP) auf dem derivativen Chromosom 8 entspricht Base 28102311 auf Chromosom 12, Bruchpunkt auf derivativem Chromosom 12 entspricht Base 73779811 auf Chromosom 8 (s. 4.2.1). Der Bruchpunkt auf der(12) weist im Gegensatz zu der(8) BP eine 5 bp Mikroduplikation auf, deren Ursprung, Klärung bedarf.

Im Folgenden war es möglich die anfänglich hypothetischen Kandidatengene bioinformatisch (UCSC *Genome browser*, NCBI) zu verifizieren. Auf dem derivativen Chromosom 8 liegt 86,128 kb strangabwärts das in der Chondrogenese essentielle *Parathyroid hormone like hormone (PTH1H)*, während 167,635 kb strangaufwärts von der(8) BP die ersten 2 Exons des Kaliumkanals *Potassium voltage-gated channel subfamily B member 2 (KCNB2)* lokalisiert sind.

Es steht ausser Frage, dass *PTH1H* das primäre Kandidatengen darstellt. Sowohl der Stellenwert von *PTH1H* in der Chondrogenese, als auch die Bedeutung dislozierter cis-regulatorischer Elemente anderer Gene wurde an embryogenetischen Beispielen bereits erläutert. Desweiteren wird in Kooperation mit der Technischen Universität in Dresden eine weitere Translokation t(4;12)(q13.2-13.3;p11.2) bearbeitet, die mit BDE einhergeht. Der Phänotyp ist identisch. Nach bisheriger zytogenetischer Kartierung liegt der Bruchpunkt auf der(4) ca. 150 kb strangaufwärts von *PTH1H*, d.h. ca. 65 kb strangaufwärts des der(8). Diese zweite Familie mit identischer humangenetischer Diagnose unterstreicht die Hypothese, dass entweder der Bruchpunkt auf der(8), respektive der(4), oder translokationsbedingt dislozierte cis-regulatorische Elemente eine *PTH1H* Dysregulation bedingen.

Hinsichtlich der hier bearbeiteten t(8;12)(q13;12p11.2) wurde der Leserahmen von *KCNB2* translokationsbedingt in Intron 2 getrennt, Exon 3 liegt 233,327 kb strangaufwärts von der(12) BP. Aufgrund der *KCNB2* Haploinsuffizienz und spekulierter Partizipation von Ionenkanälen, die Chondrozytenproliferation zu regulieren [261, 262] , ist theoretisch von einer apparenten *KCNB2* Beteiligung am Phänotyp auszugehen. Die präferierte Methode *KCNB2* embryogenetisch aus einer aktiven Beteiligung an der Chondrogenese auszuschliessen, ist *in situ* Hybridisierung an unterschiedlichen murinen Embryonenstadien. Transversale Schnitte des Embryos, sowie der Extremitäten und *whole mounts* zeigten eine verstärkte *Kcnb2* Expression in neuronalen und cerebralen Geweben mit erhöhter auditiver- und olfaktorischer-sensorischer Aktivität, sowie minimale pulmonale und urogenitale Expression (s. 4.3.1). Die Beteiligung an der Chondrogenese wurde somit molekular ausgeschlossen. Auch die Erweiterung der medizinischen Anamnese BDE betroffener

Patienten entkräftigte durch Vestibularis- und Schalleitungsprüfung eine weitere *KCNB2*-bedingte Symptomatik. Mit grosser Wahrscheinlichkeit wird die Haploinsuffizienz funktionell komplementiert.

Weiterhin stellte sich die Frage, ob putative Fusionstranskripte aus den *KCNB2* Exonen 1 und 2 mit *PTHLH* auftreten. PCR Amplifikationen an Fibroblasten-total-RNA betroffener Patienten schlossen dies aus. Allerdings besteht *KCNB2* unter anderem aus einer BTB Domäne (auch POZ Domäne), die als Protein-Protein Interaktionspartner transkriptionell regulieren oder Proteine zur Ubiquitinierung markieren kann [233, 263] . Ob von dem translokationsbedingt dissoziierten *KCNB2* Leserahmen eine funktionsfähige BTB Domäne translatiert wird und diese das benachbarte *PTHLH* transkriptionell beeinflusst oder PTHrP reguliert, ist ungeklärt.

In Bezug auf die Wildtypsituation auf Chromosom 12 liegt der Translokationsbruchpunkt von der(8) in einer 280 kb großen intergenischen Region, die von den einander zugewandten Genen *PTHLH* und *Coiled-coil domain-containing protein 91* (CCDC91, oder auch p56) flankiert wird. Die biologische Funktion von CCDC91 ist derzeit die Regulation der Vesikelbildung am trans-Golgi-Netzwerk [264] . Es kommt aufgrund des räumlich-zeitlichen Expressionsprofils als Brachydaktylie-Kandidatengenen weniger in Frage, obwohl GORAB, ein anderes Golgi-Protein, mit einem Skelettphänotyp in Verbindung gebracht wird [265] . Die Expression von CCDC91 in Chondrozyten Zelllinien und die weitere Erforschung der intergenischen Region bis *PTHLH* wird zeigen, ob CRE strangabwärts von CCDC91 translokationsbedingt abgekoppelt sind und ob CCDC91 einen weiteren Kandidaten in der molekularen Pathogenese der Brachydaktylie Typ E darstellt.

Der Hauptfokus dieser Dissertation lag auf *PTHLH*, da es in der Chondrogenese essentiell ist und bisher nicht direkt mit einer Brachydaktylie assoziiert wird.

### **Molekulare *in silico* Charakterisierung der Bruchpunkte und des *PTHLH* Promotors**

Genomische Modifikationen sind durch Umweltbedingungen, virale genomintegrierende Infektionen und legitime bzw. illegitime Rekombinationen während der Meiose bedingt. Bisher sind nur in onkologischen Fragestellungen die DNA-modifizierenden Enzyme Translin und Topoisomerase II an Translokationsbruchpunkten beschrieben [142, 145, 146] (s. 1.4.1). Die Frage, ob hochhomologe Bindungsmotive für Translin und die Topoisomerase II  $\pm 100$  bp an den Bruchpunkten vorkommen, war bioinformatisch durch Übereinstimmungen der Konsensussequenzen mit der der(8) bzw. der(12) Bruchpunktsequenz zu erklären. Homologien der symmetrischen und asymmetrischen Konsensussequenz der Topoisomerase II, sowie von Translin an beiden Translokationsbruchpunkten zwischen 69 und 89 % legen nahe, dass beide Enzyme ursächlich für die Translokation t(8;12)(q13;p11.2) verantwortlich sind. Unklar bleibt, ob die DNA Doppelstrangbrüche durch die Topoisomerase II aktiv

generiert wurden oder während eines *crossing-overs* in der Meiose I entstanden sind (s. 4.2.3). Die 5 bp Mikroduplikation an der(12) BP, vermutlich hervorgerufen durch eine ssDNA Restriktion der Topoisomerase, kann durch bisherige Erkenntnisse zur DNA Reparatur und den hier beschriebenen Enzymen nachvollzogen werden.

Bisher unzureichend beschrieben ist, wie hoch die Bindungshomologie für die katalytischen Enzymfunktionen sein muss, bzw. welche Basenpositionen der Konsensussequenz essentiell für die Erkennung von ss- / dsDNA Enden durch Translin sind, bzw. der DNA Restriktion und –Ligation durch die Topoisomerase II dienen. Guanin an Position + 2 des Bruchpunktes ist essentiell für eine dsDNA Restriktion über das asymmetrische Bindungsmotiv der Topoisomerase [136] . Dies entspricht zumindest dem *sense*-Strang auf Chromosom 12, wodurch es potentiell zu dem vorhandenen dsDNA Bruch an der(8) kommen kann.

Desweiteren wurden die Bruchpunktregionen auf evolutionäre Konservierung unter den Mammalia untersucht. Hochkonservierte Sequenzen zeigen häufig regulatorische Elemente [266] . Die bioinformatische Prädiktion von Bindungsmotiven aufgrund von Sequenzhomologien zwischen unterschiedlichen Spezies zeigt Transkriptionsfaktorbindungsstellen (TFBS) cis-aktiv oder in Promotorbereichen [186, 207, 267, 268] , deren potentielle Regulatorfunktion experimentell überprüft werden muss.

Die der(8) BP Region ist in Bezug auf Chromosom 12 stark konserviert (>70%) und durch bioinformatische Vorhersageprogramme (rVISTA, Transfac, VISTA in UCSC) wurde gezeigt, das direkt vor dem Bruchpunkt ein putatives AP1 Bindungsmotiv mit der Konsensussequenz –TGAGTCA– liegt. Bezüglich Chromosom 8, auf der(8), liegt keine Spezieskonservierung vor, allerdings eine bidirektionale Kernkonsensussequenz für ETS1 –GG<sup>A</sup>/T–. An der(12) BP, in Bezug auf Chromosom 8, entstand durch die 5 bp Mikroduplikation eine *de novo* Kernkonsensussequenz für ETS1 (s. 4.2.4). Eine noch effizientere Bindung als an der ETS1 Kernkonsensussequenz an der(8) BP - dieses Motiv weist nicht alle Basen für eine optimale Bindung auf - muss untersucht werden [269] .

Mitglieder der AP1 und ETS Transkriptionsfaktorfamilien regulieren ubiquitär essentielle Zellprozesse. Die Lokalisation des Bruchpunktes auf der(8) innerhalb einer hochkonservierten Region mit putativem Regulationspotential von AP1 und der direkten Nähe eines EBS Motives stellte die Grundlage für weitere Experimente zur Charakterisierung des der(8) Bruchpunktes. Die bioinformatische Sequenzanalyse des *PTHLH* Promotors unterstützte die Hypothese dahingehend, dass potentielle AP1 TFBS an Position 28011215 bp und 28010342 bp innerhalb des *PTHLH* Leserahmens, sowie ein ETS1 Motiv in unmittelbarer Nähe der distalen TATA-Box im *PTHLH* Promotor an Position 28016623 bp detektiert werden können. Dies spricht entweder für eine einzelne oder kombinatorische *PTHLH* Regulation durch AP1 und / oder ETS1. Goldring et al. beschreibt die Komplexität der Transkriptionsfaktor-

Involvierung während der Chondrogenese und listet entsprechend der einzelnen chondrogenetischen Stadien die bisher experimentell verifizierten Transkriptionsfaktoren auf [238]. Bezüglich der PTHrP Regulation der Chondrozyten ist bisher nur der Transkriptionsfaktor Gli3 bekannt [236]. Die genomische Distanz zwischen reguliertem Gen und strangaufwärts oder strangabwärts assoziiertem CRE kann bis zu 1,25 Mb betragen [158]. Bindungsmotive für gewebespezifische Transkriptionsfaktoren können durch Chromatinmodifikationen reguliert werden und dadurch transkriptionell agieren. Diese feinregulierten Mechanismen können bei genomischer Desorganisation zu apparenten Phänotypen führen [182]. Ob *PTHLH* aufgrund der Bruchpunktsituation reguliert wird oder ob andere dislozierte distale CRE für die *PTHLH* Regulation oder hypothetische Dysregulation verantwortlich sind, bleibt zu klären.

### ***PTHLH* Dysregulation und chondrogene *in vitro* Modellsysteme**

Die Quantifizierung von *PTHLH* in Fibroblasten zwischen BDE betroffenen Patienten und Kontrollpersonen zeigte keinen signifikanten Unterschied. Dies mag einerseits an der Vielzahl unterschiedlicher biologischer Funktionen, andererseits an den endo-, para-, auto- und juxtakrinen PTHrP Eigenschaften liegen [270, 271, 272, 273, 274, 275]. Außerdem repräsentieren die untersuchten Fibroblasten nicht Chondrozyten. Ein CRE, das durch die Translokation physikalisch von dem genomischen *PTHLH* Kontext getrennt wird, kann nur in Chondrozyten die *PTHLH* Dysregulation zeigen. Eine feinregulierte, entwicklungs- und gewebespezifische *PTHLH* Expression ist notwendig [276], bis *dato* wenig verstanden und bedarf in dieser Dissertation ein die proliferativen Chondrozyten repräsentierendes *in vitro* Modell, da die molekulare Pathogenese der Brachydaktylie nur während der proliferativen Chondrogenese-phase stattfinden kann. Gerät die Balance zwischen proliferativen und hypertrophen Chondrozyten in ein Ungleichgewicht, verändern sich die gesamten Knorpelanlagen und ein skeletaler Phänotyp ist die Folge. Die Pthrp oder *Indian hedgehog* (Ihh) Überexpression, *knockout* oder die Mutante mit Brachydaktylie-ähnlichen Phänotypen machen die Bedeutung der *Pthlh* Funktion und Regulation im Tiermodell deutlich [104, 125, 127, 259, 260].

Chondrogene Differenzierungs- und Regulationsmechanismen *in vitro* zu studieren, stellt extreme Hindernisse dar. Primäre murine Chondrozyten differenzieren *in vitro* innerhalb von 96 h zu fibroblastenähnlichen Zellen (pers. Kommunikation M.B. Goldring, S. Stricker), reproduzierbare Experimente sind nahezu unmöglich. Adulte differenzierte Chondrozyten weisen ein anderes Expressionsmuster auf, als initial proliferative Chondrozyten. C28/I2 Chondrozyten repräsentieren humane proliferative und prähypertrophe Chondrozyten und eignen sich für *in vitro* Experimente [208]. Eine zweite Alternative sind murine ATDC5

Zellen, einem embryonalen Teratokarzinom entstammend, die durch ITS entsprechend der *in vivo* Chondrogenese differenziert werden können. Chondrogene Differenzierungen und Signaltransduktionen können *in vitro* nachvollzogen werden [277, 278, 279] . Knorpelmarker, wie *Sox9*, *Aggrecan*, *Col2a1*, *Col10a1*, *Ihh* und *Pthlh* werden während der Differenzierung exprimiert [280] (s. 4.4.3). Die Differenzierung an Tag 9 repräsentierte die optimale Knorpelmarker-Expression von hoch proliferativen Chondrozyten.

Für funktionale Experimente war es erforderlich die Struktur des *PTH LH* Promotors zu kennen, und potentielle Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren zu identifizieren. Die zellspezifische und feinregulierte *PTH LH* Transkription kann ausgehend von zwei TATA-Box Promotoren und einem GC-reichen Promotor gestartet werden [55, 56, 57, 58, 59] . Chondrozytäre *PTH LH* Transkripte sind bisher nicht analysiert worden. Die 5' RACE PCR identifizierte die knorpelspezifischen *PTH LH* Transkripte in ATDC5 und C28/I2 Zellen. Der *PTH LH* TSS ist strangabwärts des GC-reichen Promotors an der Stelle höchster Konservierung hinsichtlich der gesamten Promotorregion. Desweiteren fand rVISTA auch hier hochkonservierte Elemente für potentielle AP1 und ETS1 Bindung (s. 4.4.4). Dies bestärkt die Hypothese der einzelnen oder kombinatorischen *PTH LH* Regulation durch AP1 und / oder ETS1 Faktoren. Für funktionelle Reporterassays wurde der gesamte *PTH LH* Promotorbereich (3080 bp) verwendet, da die transkriptionelle Nutzung der 3. TATA-Box, sowie additive transkriptionell aktive Elemente strangabwärts der chondrozytären TSS nicht ausgeschlossen werden können.

Anhand dieser geeigneten ATDC5 und C28/I2 Chondrozyten sollte der(8) BP auf die potentielle Bindung von AP1 und ETS1 und der Bezug zu *PTH LH* untersucht werden. Außerdem sollte die Hypothese der translokationsbedingten *PTH LH* Dysregulation verifiziert werden.

### **Funktionelle Bruchpunktanalyse**

Aktive cis-regulatorische Elemente liegen genomisch als Euchromatin mit charakteristischen Histonmodifikationen vor, die gegenüber heterochromatischen Regionen unterschiedlich modifiziert und angereichert sind. *Enhancer* sind durch H3K4me1 gekennzeichnet [281] , *Silencer* durch H3K9me3 und H3K27me3. Aktive Promotorbereiche zeigen starke Anreicherung von H3K4me3 [197, 281] . Durch Chromatin Immunopräzipitationen (ChIP) sollte geklärt werden, ob die hochkonservierte Sequenz an der(8) BP regulatorspezifische Histonmodifikationen aufweist, die zu transkriptionell aktivem Chromatin führen, das im Weiteren durch Bindung von AP1 und ETS1 Transkriptionsfaktoren potentiell das strangabwärts gelegene *PTH LH* regulieren kann.

Die ChIP-Positivkontrollen an 1. *PTHLH* TATA-Box, sowie am *PTHLH* TSS waren eindeutig und entsprachen mit einer Anreicherung von H3K4me3 der Histonmodifikation an Promotoren [197]. Stark angereichertes H3K4me3 war im Gegensatz zu keiner Histonmodifikation an der nichtkonservierten wt(8) Sequenz repräsentiert. Wt(12) zeigte eine Anreicherung von H3K4me1. Charakteristisches Euchromatin mit potentiell aktivierenden Regulationseigenschaften liegt somit vor. Die Bedeutung der ausbalancierten H3K4me3 und H3K9me3 Anreicherung an wt(12) spricht dafür, dass diese Region entweder nur partiell oder temporär in bestimmten Stadien der Embryogenese aktiv als Regulator genutzt wird (s. 4.5.1). Die Kinetik der ChIP Experimente war unter ATDC5 U, ATDC5 9d und C28/I2 Chromatin vergleichbar. Die signifikant stärkere Anreicherung von Histonmodifikationen in undifferenzierten ATDC5 Zellen ist durch nicht sezernierte extrazelluläre Matrix (ECM) zu erklären. Differenzierte ATDC5 9d und C28/I2 Zellen bilden chondrogene ECM, die eine Chromatinpräparation erschwert.

Die ChIP von BDE-Fibroblasten an der(8) BP zeigte unterschiedliche epigenetische Modifikationen an wt(12) und der(8) Allel. H3K4me1 und H3K4me3 waren an der(8) BP zweifach stärker angereichert, als an wt(12). Starke H3K4me1 und minimal reduzierte H3K4me3 Anreicherungen werden als *Enhancer* in HeLa Zellen detektiert [197]. Desweiteren werden H3K4me1 und H3K4me3 an Bruchpunkten assoziiert mit T-Zell Lymphomen gefunden [281] und H3K4me3 mit H3K27me3 werden als embryogenetisch essentielle Histonmodifikationen vorgeschlagen [282]. Bei t(8;21) Translokationen in hämatopoetischen Zellen, die häufig eine akute myeloische Leukämie bedingen, werden im Vergleich zu HeLa Zellen unterschiedliche Histonmodifikationen an einem Genlocus aufgezeigt [283]. Dieses Erkenntnis ist nicht überraschend, da transkriptionelle und epigenetische Mechanismen in Zellen verschiedener Gewebe unterschiedlich reguliert werden. Die epigenetisch allelspezifische Chromatinmodifizierung in Patientenfibroblasten zeigt allerdings die fundamentalen Prozesse bei chromosomalen Aberrationen. Unter anderem hat die Translokation Einfluss auf epigenetische Modifikationen im Bereich des Bruchpunktes auf der(8) und legt die Hypothese nahe, dass aufgrund von H3K4me1, als charakteristische *Enhancer*-Histonmodifikation, potentiell *PTHLH* reguliert wird. Der Begriff *Enhancer* bzw. *Silencer* bedarf weiterer Klärung. Euchromatin, früher charakterisiert durch angereicherte *Enhancer* Histonmodifikationen, beschreibt lediglich aktives offenes Chromatin, an das positiv oder negativ regulierende Transkriptionsfaktoren binden können. Die Beschreibungen der Ergebnisse und Schlussfolgerungen dieser Dissertation benutzen den Begriff Regulator, der aktivierende und inhibierende Regulation impliziert.

Die Involvierung der Topoisomerase II an genomischen Bruchpunkten ist bekannt. Die Chromatinneuorganisation bedarf allerdings weiterer Klärung [281, 283]. Ob und inwieweit

Translin eine Modifizierung des Chromatins bedingt, oder nur der Erkennung von ss- oder dsDNA Enden dienlich ist, bleibt bislang unklar.

Die positive Identifikation des Euchromatins an der(8) BP lässt den Schluss zu, dass AP1 und ETS1 Transkriptionsfaktoren am der(8) BP binden können. EMSA Experimente verifizierten diese Schlussfolgerung. AP1 wurde durch rekombinantes humanes c-jun repräsentiert und band an wt(12) und der(8), wohingegen rekombinantes C-ets-1 an der(8) und, bedingt durch die EBS-Kernkonsensussequenz, auch an wt(8), aber nicht an wt(12) band (s. 4.5.3).

C-ets-1 zeigte an wt(8) eine schwache Signalstärke. Dies beruht darauf, dass nicht wie bei dem ETS1 Kontrolloligo alle Basen für optimale Bindung vorhanden sind [269, 284] . Aufgrund der ChIP-Daten an wt(8) (s. Abb. 26 D), die keinen Hinweis auf Eu- oder Heterochromatin gaben, ist auch von keiner regulatorischen Aktivität durch C-ets-1 auszugehen.

### **Chondrogene *PTH LH* Regulation und Dysregulation *in vitro***

Die bisherigen Daten zeigten eindeutig das genregulatorische Potential des Bruchpunktes auf der(8). In Reporterassays mit dem spezifischen *PTH LH* Promotor sollte in murinen und humanen Chondrozyten die suggerierte *PTH LH* Regulation durch wt(12) und der(8) BP untersucht werden. Zusätzlich wurde durch die dreifach repetitive Sequenz des jeweiligen Regulators vor dem *PTH LH* Promotor, der aktivierende oder reprimierende Effekt verifiziert. Wt(8) aktivierte *PTH LH* minimal aufgrund des EBS Motives, allerdings hatte die Sequenzrepetition keinen Effekt. Die AP1 Konsensussequenz auf wt(12) aktivierte die *PTH LH* Transkription. Das dreifache Bindungsmotiv zeigte additive Wirkung. Der(8) BP mit AP1 und ETS1 wirkte auch aktivierend, allerdings war kein signifikant stärkerer oder schwächerer Effekt im Vergleich zu wt(12) zu beobachten. Der(8)x3 wirkte nicht additiv aktivierend, sondern reprimierend (s. 4.5.2), trotz drei vorhandenen AP1 Bindungsstellen. Möglicherweise basiert dies einerseits auf der unvollständigen ETS1 Bindungssequenz, andererseits dem zu geringen Abstand zwischen AP1 und ETS1 bindungsrelevanten und –unrelevanten Nukleotiden. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die AP1 gerichtete *PTH LH* Regulation durch ETS1 sekundär gesteuert wird und deshalb keine signifikante Aktivitätssteigerung im Vergleich wt(12) zu verzeichnen ist. Neben der Notwendigkeit den Effekt eines kompletten ETS1 Bindungsmotives strangaufwärts des *PTH LH* Promotors zu testen, muss auch die Reihenfolge der Motive im Reporterkonstrukt untersucht werden. Bis *dato* stehen Experimente zur Chromatinschleifenbildung bei cis-regulierter Genregulation durch kombinierte CRE oder mehrere TFBS in einem CRE aus. Je nach Schleifenausbildung und Promotorstruktur des regulierten Gens könnten die TFBS-Reihenfolge und der TFBS-Abstand



in einem CRE oder zwischen mehreren CRE, sowie die durch CRE aktivierten transkriptionell beteiligten Elemente des Promotors, Einfluss auf die Dosis der Genregulation haben.

Die Ergebnisse der Reporterassays sprechen für die *PTH1H* Regulation durch den der(8) BP. PMA, eine die Tumorbildung unterstützende Substanz, zeichnet sich durch seine AP1 und ETS1 aktivierenden Eigenschaften aus [247, 248] . Es ist hypothetisch von einer PMA-induzierten AP1 und ETS1 Aktivierung auszugehen, die im Weiteren die *PTH1H* Expression hochreguliert. Zwecks dieser Annahme wurden ATDC5 und C28/I2 Chondrozyten *in vitro* mit PMA stimuliert und zeigten entsprechend der Zeit und des Stimulus die erwartete verstärkte c-jun und C-ets-1 Proteinexpression. PTHrP wurde in den Chondrozytenzelllinien und PMA-stimulierten Fibroblasten von betroffenen Patienten und Kontrollprobanden hochexprimiert (s. 4.5.4). Die Quantifizierung von PTHrP zwischen betroffenen Patienten- und Kontroll-Fibroblasten war aufgrund des generellen PMA Effekts nicht sinnvoll.

Die humanen C28/I2 Chondrozyten wiesen eine deutlich signifikantere Kinetik auf und wurden für weitere funktionelle *in vitro* Experimente bevorzugt verwendet. Zuzufolge der generalisierenden Wirkung von PMA, bspw. die Expression der Proteinkinase C über den Transkriptionsfaktor NFkB stimulieren zu können [249] , ist es notwendig, den AP1- und ETS1-spezifischen Effekt zur *PTH1H* Regulation darzustellen. Diese Notwendigkeit wurde durch die bioinformatische Analyse von potentiellen NFkB TFBS im *PTH1H* Leserahmen bzw. Promotorbereich erweitert, die an Position 28016025 bp und 28012534 bp vorhanden sind (s. 4.4.4).

Es ist bereits vielfach publiziert, dass AP1 Heterodimere mit ETS1 Proteininteraktionen formieren, die transaktivatorisch genregulativ wirken. Die Transaktivierung ist bei dem *Urokinase-Type Plasminogen Activator*, dem Tumorsupressor *Maspin*, dem *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1* und am *Granulocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor* (GM-CSF) Promotor nachgewiesen [246, 250, 251, 285, 286, 287] . ETS allein oder in Kooperation mit SP1, TGF- $\beta$ , CBP (*CREB binding protein*) und der Proteinkinase C (PKC) zeigen in Brustkrebszellen und bei Prostatakarzinomen eine PTHrP-Regulation [288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295] . Bezüglich AP1 wird gezeigt, dass PTHrP durch das humane T-Zell Leukämie Virus Typ I (HTLV-I) Tax, HTLV-II Tax Protein und durch c-jun in T-Zellen, aber nicht in B-Zellen und Fibroblasten transaktiviert wird [296] . Weiterhin ist bekannt, dass Mitglieder der AP1 TF-Familie, c-jun, jun-D und c-fos, die Chondrozytenreifung reprimieren bzw. die Knochenbildung regulieren [235, 297, 298] . Bei *in vitro* Zelldifferenzierungsstudien ist die AP1-Aktivität bei der chondrogenen Differenzierung von mesenchymalen Zellen notwendig, bleibt allerdings konstant und unterliegt keiner positiven oder negativen Regulation [299] . Prächondrogene nukleäre Extrakte von chondrogen differenzierten dermalen Fibroblasten binden verstärkt an AP1 responsive CRE [300] . Diese Erkenntnisse

lassen auf eine fundamentale AP1-Beteiligung in prä- und chondrogenetischen Stadien und deren Regulationsprozessen schliessen. Aufgrund der allgemeinen AP1 / ETS1 Interaktionen und Transaktivierungen, sowie der einzelnen AP1 oder ETS1 Regulation des *PTH LH* Promotors in nichtchondrogenen Zellen, stellte sich die Frage, ob *PTH LH* spezifisch durch AP1 und ETS1 in Chondrozyten reguliert wird. Die Überexpression durch transfizierte AP1 und ETS1 Expressionsplasmide sollte in C28/I2 Zellen die grundlegende Bedeutung der *PTH LH* Regulation deutlich machen. Die Expressionsplasmide für *c-JUN*, *JUN-B*, *c-FOS* und *ETS1* aktivierten die PTHrP Expression. Außerdem wurden bekannte wechselseitige Regulationsmechanismen zwischen AP1 Faktoren und *ETS1* reproduziert. AP1 Heterodimere, vornehmlich jun-B mit c-fos, induzierten die PTHrP Expression stärker als c-jun Homodimere. Die Kombinationen aus c-jun / jun-B oder c-jun / c-fos Heterodimeren mit C-ets-1 zeigten die stärkste PTHrP Transaktivierung in Relation zur pcDNA3.1 Leervektor-Transfektionskontrolle (s. 4.5.5). Diese Daten verifizierten die Hypothese, dass PTHrP in Chondrozyten durch AP1 und C-ets-1 positiv reguliert wird und erweitern die bisher beschriebenen Signaltransduktionen der Chondrogenese. Insbesondere werden aber AP1 und *ETS1* als neue chondrogene *PTH LH* Regulatoren dargestellt. Die hypothetische translokationsbedingte PTHrP Dysregulation der Brachydaktylie Pathogenese kann nur indirekt bestätigt werden. Die bisher generierten Daten sprechen für eine aktivierende PTHrP Expression durch AP1 und C-ets-1 in ATDC5 und C28/I2 Wildtyp-Chondrozyten. In Bezug auf die phänotypischen Charakteristika in Pthrp-überexprimierenden und Pthrp-*knockout* Mäusen kann theoretisch PTHrP in BDE Chondrozyten durch die Translokation auch reprimierend reguliert worden sein. Das Resultat eines reprimierenden Effekts auf *PTH LH* bei der(8) BP Reportergerassays spricht für diese Annahme.

AP1 an der(8) BP kann *PTH LH* positiv regulieren. AP1 und *ETS1* an der(8) BP reprimieren die *PTH LH* Transkription (s. 4.5.2). Die AP1 / *ETS1* Überexpression in Chondrozyten-Zelllinien zeigte die bereits in anderen Systemen und Fragestellungen beschriebene AP1 / *ETS1* Transaktivierung in Bezug auf *PTH LH*. Ob die konservierte Region mit dem AP1 Motiv auf Chromosom 12p auch im Wildtyp *PTH LH* reguliert und diese Funktion durch die Translokation und das ETS1 Motiv gehemmt wird, oder ob weiter strangaufwärts gelegene Regulatoren *PTH LH* regulieren, muss geklärt werden. Für Letzteres spricht auch die bisherige Bruchpunkt-Lokalisation der weiteren BDE Familie mit t(4;12)(q13.2-13.3;p11.2) in Dresden. Das Verhältnis der *PTH LH* Quantifizierung zwischen Kontrollpersonen und BDE Patienten zeigte in Fibroblasten keinen Unterschied. Die BDE Pathogenese und die hypothetische *PTH LH* Dysregulation muss in der Chondrogenese stattfinden und lässt auf die gewebespezifische chondrogene *PTH LH* Regulation schliessen. Diese Hypothese konnte nur durch chondrogenes Patientenmaterial bestätigt werden. Chondrogeninduzierte

Patientenfibroblasten wurden als Pelletkultur kultiviert. Die signifikante Expressionssteigerung der Knorpelmarker *COL2A1* und *Aggrecan*, sowie die positiven Ergebnisse der Alzianblau und Safranin O Färbung, stellten die chondrogeninduzierten Fibroblasten als geeignetes BDE-orientiertes chondrogenes *in vitro* Modell für die *PTH1H* Quantifizierung dar. *PTH1H* ist in BDE Patienten signifikant inhibiert und verifiziert die Hypothese, dass PTHrP aufgrund der Translokation während der Chondrogenese negativ reguliert wird. Zusätzlich ist *IHH* im BDE Patienten hochreguliert (s. 4.5.6). Der Mechanismus entspricht bisherigen Modell-Ergebnissen zu den Regulationsprozessen in der chondrogenen Wachstumsplatte [54, 274, 301, 302] (s. Abb. 4), und erklärt in dieser Dissertation erstmals die molekulare Pathogenese einer humanen Brachydaktylie Typ E durch fehlreguliertes PTHrP.

Das translokationsbedingt negativ dysregulierte *PTH1H* unterdrückt nicht mehr die vorzeitige hypertrophe Chondrozytenreifung und *IHH* Expression. *IHH* wird nicht kontrolliert, sondern höher exprimiert, und stimuliert frühzeitig die Differenzierung von periartikulären in kolumnare Chondrozyten. Dies forciert die Bildung kürzerer fetaler Wachstumsplatten und verkürzte Extremitäten als klinisch apparente Brachydaktylie Typ E sind die Folge.

## Ausblick

Die hier vorgestellten Erkenntnisse zur chondrogenen *PTH1H* Regulation durch AP1 und ETS1 stellen die Grundlage für weitere Studien. Die *IHH* Expression muss nach stimulierter PTHrP Expression dargestellt werden, da beide Morphogene einer wechselseitigen Regulation unterliegen. Desweiteren stellt sich die Frage, ob das AP1 / ETS1 vermittelte PTHrP Level zur beschriebenen Regulation von *c-fos* und *Collagen type X, alpha 1 (COL10A1)* führt [303, 304, 305] . *Pthlh* und *c-fos knockout*-Mäuse zeigen in den enchondralen Wachstumsplatten grosse Ähnlichkeiten [126, 127, 306] . Beide Signaltransduktoren wirken reprimierend auf die Differenzierung der Chondrozyten. In Bezug auf die Bedeutung in der Chondrogenese könnte dies bedeuten, dass PTHrP einerseits die *c-fos* Expression stimuliert, wodurch die Chondrozytendifferenzierung inhibiert wird, andererseits PTHrP-negativ reguliertes *COL10A1* [304] zur verzögerten Chondrozytenreifung und Bildung der hypertrophen extrazellulären Chondrozytenmatrix führt. *COL10A1* Mutationen sind mit einer metaphysealen Chondrodysplasie des Typs Schmid (MCDS; OMIM 156500) assoziiert, die u.a. mit verkürzten Knochen der Extremitäten einhergehen kann. Der Stellenwert von *COL10A1* ist chondrogenetisch gesehen sekundär, da die Expression erst in den hypertrophen Chondrogenesestadien stattfindet. Die primäre Relevanz für ein reguläres Knorpelmodell und –wachstum liegt in der *PTH1H* Regulation zwischen prächondrogenen und periartikulär proliferativen Chondrozytenstadien.

Aufgrund der generierten Ergebnisse zur AP1- und ETS1-gerichteten chondrogenen *PTHLH* Regulation wird versucht, die spezifischen CRE im Wildtyp zu identifizieren. Entweder handelt es sich um die konservierte regulatorische Sequenz an den Bruchpunkten der(8) und der(4), der angeführten zweiten BDE Familie, oder um weiter strangaufwärts gelegene Regulatoren. Der Vergleich von ChIP mit AP1 und C-ets-1 Antikörpern am der(8) Bruchpunkt und unbetroffenen wt(12) Allel wird das Mengenverhältnis von AP1 und C-ets-1 Transkriptionsfaktoren quantifizieren. Dadurch kann man zeigen, ob C-ets-1 aufgrund der unmittelbaren Nähe zum AP1 Motiv die Bindung von *PTHLH* aktivierenden AP1 Transkriptionsfaktoren an der(8) BP inhibiert und die reduzierte *PTHLH* Expression die Folge ist. Die Transfektionen mit AP1 und *ETS1* Expressionsplasmiden sprechen im Wildtyp für eine synergistische transaktivatorische *PTHLH* Regulation. Sofern AP1 und ETS1 an der(8) BP *PTHLH* negativ regulieren, könnte dies neben anderen dislozierten CRE die Ursache für die *PTHLH* Fehlregulation sein.

Des Weiteren liegt das Hauptaugenmerk auf bioinformatisch annotierten konservierten Regionen strangaufwärts des der(8) Bruchpunktes. Präferentiell wird auf AP1 und ETS1 bindende Motive geachtet, die entweder in einem oder mehreren CRE lokalisiert sind. ChIP für Histonmodifikationen oder spezifisch für AP1 und ETS1 werden in einem *whole genome amplification* Amplifikationsschritt [307] angereichert und auf einen Chip hybridisiert. Die Region von *PTHLH* bis zum Centromer von Chromosom 12 entspricht etwa  $6,5 \times 10^6$  Basen und wird bis auf hochrepetitive Sequenzen in isothermalen Oligonukleotiden mit einem *spacing* (Abstand) zwischen 12 – 38 bp repräsentiert [197] .

Für die Identifizierung und Verifizierung einiger durch ChIP Chip detektierten CRE, eignet sich eine molekular-zytogenetische Methode, die auf Kolokalisations-FISH an Interphasenuklei beruht. Die DNA zwischen Promotor und CRE wird gekrümmt und bildet die beschriebenen Chromatinschleifen aus [182] . Der Promotorbereich eines Gens, markiert durch eine promotor-spezifische FISH-Sonde, kommt physikalisch in Kontakt zum markierten CRE [189, 308] . Unter Verwendung geeigneter Positiv- und Negativ-Kontrollen [309] ist es möglich, signifikante Unterschiede in den physikalischen Abständen zu detektieren, die valide Hinweise auf eine, oder keine, Kolokalisation und somit cis-regulierte Genexpression liefern. Humane C28/I2 Chondrozyten dienen *in vitro* als Modell. SOX9 ist die Positivkontrolle [189] . Für eine signifikante Aussage muss pro unterschiedlich markiertem Sondenpaar in 40-60 Interphasenuklei der physikalische Signalabstand gemessen werden. Bei der Analyse von 50 Interphasekernen einer Positiv-Kontrolle mit durchschnittlichem Signalabstand von  $0,61 \mu\text{m}$  und einer Negativ-Kontrolle mit durchschnittlichem Signalabstand von  $1,35 \mu\text{m}$ , ist der signifikante Unterschied  $p \leq 1,56 \times 10^{-8}$  [189] .

Die Existenz *PTHLH*-relevanter Regulatoren in Entfernungen von  $> 1$  Mb des Transkriptionsstarts kann nicht ausgeschlossen werden. Im Rahmen genomweiter Analysen von Kopienzahlpolymorphismen sind  $\pm 500$  kb von *PTHLH* keine Variationen gefunden worden [310]. Die nächstgelegenen, auch in normalen Probanden zu findenden Deletionen in Richtung Centromer betreffen die Loci 1874 [311] und 0206 [312], etwa jeweils 2 Mb strangaufwärts von *PTHLH*. Diese Loci stellen vermutlich keine essentiellen *PTHLH*-relevanten CRE dar, da monoallelische Deletionen dieser Region auch in phänotypisch inapparenten Individuen zu finden sind. Jenseits dieser Loci können theoretisch *PTHLH*-relevante Regulatoren sein, deren Funktion in der Kolokalisations-FISH überprüft wird.

Neben der molekularen Pathogenese, die den Phänotyp der Brachydaktylie Typ E bedingt, liefern diese Erkenntnisse einerseits wichtige Beiträge zur aktuellen Forschung auf dem Gebiet der embryonalen Skelettentwicklung, andererseits wird das Prinzip der Genregulation durch konservierte cis-regulatorische Elemente bei chromosomalen Aberrationen im Vergleich zum Wildtyp dargestellt. Die hohe Relevanz einer detaillierten Charakterisierung genomischer Bruchpunkte, präferentiell in konservierten Regionen, wird in dieser Dissertation deutlich. Aufgrund des apparenten Phänotyps und der balancierten Translokation kann auf die bisher unbekannte AP1 und ETS1 chondrozytär-gewebespezifische *PTHLH* Regulation geschlossen und sie untersucht werden. Des Weiteren wird aufgezeigt, welche fundamentale Bedeutung ein Zusammenschluss von Transkriptionsfaktorbindungsstellen in konservierter Sequenz haben kann. Gegenstand weiterer Studien wird die Frage sein, wie viele und welche *de novo* cis-regulatorische Elemente im humanen Genom existieren, für differentielle Genregulation verantwortlich sind und individuelle humane Charakteristika bedingen.

## 6. Zusammenfassung

In dieser Dissertation wurde ein bisher uncharakterisierter Locus für eine isolierte Brachydaktylie vom Typ E (BDE) im Detail untersucht. Grundlage war eine Familie mit autosomal-dominanten Erbgang BDE. Der genetische Hintergrund ist eine durch Metaphase-FISH detektierte balancierte Translokation  $t(8;12)(q13;p11.2)$  in betroffenen Familienmitgliedern. Der Bruchpunkt auf derivativem Chromosom der(8) liegt 86 kb strangaufwärts des chondrogenetisch essentiellen Kandidatengens *PTH LH* (*Parathyroid hormone like hormone*). *PTH LH* ist für die Differenzierungsrate von proliferativen Chondrozyten verantwortlich. Positiv oder negativ dysreguliertes *Pthlh*, sowie dessen Gegenspieler *Ihh* (*Indian hedgehog*) führen zu einer Dysbalance und verkürzten Extremitäten mit Brachydaktylie-ähnlichen Phänotypen in murinen Tiermodellen.

Der Leserahmen des Kaliumkanals *KCNB2* auf Chromosom 8 wurde durch die Translokation in Intron 2 getrennt. Chondrogenetische *KCNB2* Funktionen konnten durch *in situ* Hybridisierungen ausgeschlossen werden.

Metaphase-FISH Experimente und *Southernblotting* engten die kritischen Bruchpunktregionen ein. Durch Sequenzierung konnten die Translokationsbruchpunkte identifiziert und genau lokalisiert werden. Der Translokationsbruchpunkt auf der(8) liegt in einer in Mammalia hochkonservierten Region und beinhaltet ein Bindungsmotiv für AP1 Transkriptionsfaktoren. Durch die Translokation befindet sich in unmittelbarer Nähe eine Kernkonsensussequenz für ETS Transkriptionsfaktoren. AP1 und ETS Transkriptionsfaktoren interagieren und wurden in dieser Arbeit auf eine potentielle *PTH LH* Regulation untersucht. Epigenetische Histonmodifizierungen (H3K4me1, H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3), charakteristisch für cis-regulatorische Elemente, sowie Reporterassays mit AP1 und ETS1 Bindungsmotiven vor dem *PTH LH* Promotor zeigten einen Bezug zur *PTH LH* Regulation. Bindungsassays mit AP1 und ETS1 Transkriptionsfaktoren an den Bruchpunktsequenzen, sowie funktionelle *in vitro* Experimente mit Chondrozyten verifizierten die Hypothese, dass der Translokationsbruchpunkt strangaufwärts von *PTH LH* regulatorische Eigenschaften besitzt. Die *in silico* identifizierten AP1 und ETS1 Transkriptionsfaktoren regulierten *PTH LH* positiv in murinen (ATDC5) und humanen (C28/I2) Chondrozyten. In chondrogen induzierten Patientenfibroblasten war die *PTH LH* Expression inhibiert, die *IHH* Expression aktiviert. Die molekulare Pathogenese der BDE wurde durch die bisher unbekannte chondrogene *PTH LH* Fehlregulation dargestellt. Des Weiteren wurde die hohe Relevanz genomische Bruchpunkte detailliert zu charakterisieren deutlich.

## 7. Abstract

We studied a 3-generation family with Brachydactyly Type E and identified a t(8;12)(q13;p11.2) translocation. We used metaphase-FISH with flanking and breakpoint overlapping BACs to characterize the translocation and identified PTHLH (Parathyroid hormone like hormone) on chromosome 12p11.2 and the ionchannel KCNB2 on chromosome 8q13 as candidate genes. KCNB2 was disrupted in intron 2, while the chromosome 12 breakpoint is localized 86 kb upstream of PTHLH; only the latter gene and its translated peptide PTHrP are involved in skeletal development. The 12p11.2 breakpoint is conserved and features an AP1 binding site upstream of PTHLH. Due to the translocation, an EBS (ETS binding site) core consensus sequence from 8q13 resided near the AP1 site. Since both transcription factors cooperate and interact, we tested if AP1 and ETS1 can activate PTHLH in murine (ATDC5) and human (C28/I2) chondrocytes. We used the breakpoint sequences of the derivative chromosomes 8 and 12 (der(8), der(12)) and the nonaffected chromosome 8 and 12 allele sequences in reporter-gene assays. Reporter-gene constructs containing the der(8) breakpoint in front of the PTHLH promoter revealed activation in murine and human chondrocytes. The enrichment of four histone modifications (H3K4me1, H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3) implicating cis-regulatory effects are investigated in the breakpoint area. We found the enriched histone H3K4me1 modification at the chromosome 12 breakpoint position in murine and human chondrocytes, while affected fibroblasts showed higher H3K4me1 enrichment at the der(8) breakpoint compared to wt(12) allele. Furthermore, the breakpoint sequence bound to recombinant human AP1 and C-ets-1 in EMSA. Western blotting after PMA-stimulated AP1 and ETS1 activation and overexpression of different AP1 and ETS1 combinations showed activated PTHrP expression in ATDC5 and C28/I2 chondrocytes. In chondrogenic induced BDE fibroblasts the PTHLH expression was inhibited, while IHH was upregulated. We suggest that PTHLH is dysregulated by the translocation breakpoint in chondrocytes from our patients. This could lead to type E brachydactyly by IHH-forced differentiation of periarticular to columnar chondrocytes and PTHLH-lacked prevention of premature chondrocyte differentiation. On the one hand the data highlights the impact to characterize genomic breakpoints in detail; on the other hand we demonstrate a novel AP1- and ETS1-directed chondrogenic PTHLH regulation in wild-type chondrocytes and PTHLH dysregulation in the pathogenesis of Brachydactyly Type E.

## 8. Referenzen

- [1] Wolpert L., Beddington R., Brockes J. (1999): Entwicklungsbiologie, Spektrum Lehrbuch.
- [2] Gilbert, Scott F. (2000): Developmental Biology (Band 6th Edition), Sinauer Associates, Inc.
- [3] Capdevila, J. und Izpisua Belmonte, J. C. (2001): Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development, Annu Rev Cell Dev Biol (Band 17), Seite 87-132. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11687485](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11687485)
- [4] Kornak, U. und Mundlos, S. (2003): Genetic disorders of the skeleton: a developmental approach, Am J Hum Genet (Band 73), Nr. 3, Seite 447-74. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12900795](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12900795)
- [5] Chiang, C.; Litingtung, Y.; Lee, E.; Young, K. E.; Corden, J. L.; Westphal, H. und Beachy, P. A. (1996): Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function, Nature (Band 383), Nr. 6599, Seite 407-13. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8837770](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8837770)
- [6] Summerbell, D.; Lewis, J. H. und Wolpert, L. (1973): Positional information in chick limb morphogenesis, Nature (Band 244), Nr. 5417, Seite 492-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=4621272](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4621272)
- [7] Karsenty, G. (1998): Genetics of skeletogenesis, Dev Genet (Band 22), Nr. 4, Seite 301-13. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9664683](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9664683)
- [8] JW Saunders Jr, MT Gasseling (1968): Ectoderm-mesenchymal interactions in the origin of wing symmetry, D Fleischmajer, RE Billingham, Epithelial-mesenchymal interactions, Williams and Wilkins, Baltimore.
- [9] Martin, G. R. (1998): The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs, Genes Dev (Band 12), Nr. 11, Seite 1571-86. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9620845](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9620845)



- [10] Saunders, JW (1948): The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm, J Exp Zool (Band 108), Seite 363-404.
- [11] MacCabe, J. A.; Errick, J. und Saunders, J. W., Jr. (1974): Ectodermal control of the dorsoventral axis in the leg bud of the chick embryo, Dev Biol (Band 39), Nr. 1, Seite 69-82. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=4836526](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4836526)
- [12] Tonkin, M. A. (2004): An introduction to congenital hand anomalies, Handchir Mikrochir Plast Chir (Band 36), Nr. 2-3, Seite 75-84. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15162305](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15162305)
- [13] Rodriguez-Esteban, C.; Schwabe, J. W.; De La Pena, J.; Foys, B.; Eshelman, B. und Belmonte, J. C. (1997): Radical fringe positions the apical ectodermal ridge at the dorsoventral boundary of the vertebrate limb, Nature (Band 386), Nr. 6623, Seite 360-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9121551](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9121551)
- [14] Laufer, E.; Dahn, R.; Orozco, O. E.; Yeo, C. Y.; Piseni, J.; Henrique, D.; Abbott, U. K.; Fallon, J. F. und Tabin, C. (1997): Expression of Radical fringe in limb-bud ectoderm regulates apical ectodermal ridge formation, Nature (Band 386), Nr. 6623, Seite 366-73. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9121552](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9121552)
- [15] Wan, M. und Cao, X. (2005): BMP signaling in skeletal development, Biochem Biophys Res Commun (Band 328), Nr. 3, Seite 651-7. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15694398](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15694398)
- [16] Loomis, C. A.; Harris, E.; Michaud, J.; Wurst, W.; Hanks, M. und Joyner, A. L. (1996): The mouse Engrailed-1 gene and ventral limb patterning, Nature (Band 382), Nr. 6589, Seite 360-3. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8684466](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8684466)
- [17] Parr, B. A. und McMahon, A. P. (1995): Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb, Nature (Band 374), Nr. 6520, Seite 350-3. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7885472](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7885472)
- [18] Yang, A.; Schweitzer, R.; Sun, D.; Kaghad, M.; Walker, N.; Bronson, R. T.; Tabin, C.; Sharpe, A.; Caput, D.; Crum, C. und McKeon, F. (1999): p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development, *Nature* (Band 398), Nr. 6729, Seite 714-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10227294](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10227294)
- [19] Mills, A. A.; Zheng, B.; Wang, X. J.; Vogel, H.; Roop, D. R. und Bradley, A. (1999): p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis, *Nature* (Band 398), Nr. 6729, Seite 708-13. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10227293](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10227293)
- [20] Niswander, L.; Tickle, C.; Vogel, A.; Booth, I. und Martin, G. R. (1993): FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb, *Cell* (Band 75), Nr. 3, Seite 579-87. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8221896](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8221896)
- [21] Naski, M. C. und Ornitz, D. M. (1998): FGF signaling in skeletal development, *Front Biosci* (Band 3), Seite d781-94. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9683641](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9683641)
- [22] Riddle, R. D.; Johnson, R. L.; Laufer, E. und Tabin, C. (1993): Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA, *Cell* (Band 75), Nr. 7, Seite 1401-16. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8269518](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8269518)
- [23] Litingtung, Y.; Dahn, R. D.; Li, Y.; Fallon, J. F. und Chiang, C. (2002): Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity, *Nature* (Band 418), Nr. 6901, Seite 979-83. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12198547](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12198547)
- [24] te Welscher, P.; Zuniga, A.; Kuijper, S.; Drenth, T.; Goedemans, H. J.; Meijlink, F. und Zeller, R. (2002): Progression of vertebrate limb development through SHH-mediated counteraction of GLI3, *Science* (Band 298), Nr. 5594, Seite 827-30. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12215652](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12215652)

- [25] Sordino, P.; van der Hoeven, F. und Duboule, D. (1995): Hox gene expression in teleost fins and the origin of vertebrate digits, *Nature* (Band 375), Nr. 6533, Seite 678-81. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7791900](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7791900)
- [26] Zakany, J. und Duboule, D. (1999): Hox genes in digit development and evolution, *Cell Tissue Res* (Band 296), Nr. 1, Seite 19-25. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10199961](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10199961)
- [27] Cygan, J. A.; Johnson, R. L. und McMahon, A. P. (1997): Novel regulatory interactions revealed by studies of murine limb pattern in Wnt-7a and En-1 mutants, *Development* (Band 124), Nr. 24, Seite 5021-32. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9362463](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9362463)
- [28] Riddle, R. D.; Ensini, M.; Nelson, C.; Tsuchida, T.; Jessell, T. M. und Tabin, C. (1995): Induction of the LIM homeobox gene Lmx1 by WNT7a establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb, *Cell* (Band 83), Nr. 4, Seite 631-40. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7585966](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7585966)
- [29] Crossley, P. H.; Minowada, G.; MacArthur, C. A. und Martin, G. R. (1996): Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development, *Cell* (Band 84), Nr. 1, Seite 127-36. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8548816](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8548816)
- [30] Vogel, A.; Rodriguez, C. und Izpisua-Belmonte, J. C. (1996): Involvement of FGF-8 in initiation, outgrowth and patterning of the vertebrate limb, *Development* (Band 122), Nr. 6, Seite 1737-50. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8674413](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8674413)
- [31] Olsen, B. R.; Reginato, A. M. und Wang, W. (2000): Bone development, *Annu Rev Cell Dev Biol* (Band 16), Seite 191-220. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11031235](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11031235)
- [32] Ng, L. J.; Wheatley, S.; Muscat, G. E.; Conway-Campbell, J.; Bowles, J.; Wright, E.; Bell, D. M.; Tam, P. P.; Cheah, K. S. und Koopman, P. (1997): SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis

- in the mouse, *Dev Biol* (Band 183), Nr. 1, Seite 108-21. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9119111](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9119111)
- [33] Lefebvre, V.; Li, P. und de Crombrughe, B. (1998): A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene, *Embo J* (Band 17), Nr. 19, Seite 5718-33. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9755172](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9755172)
- [34] Ikeda, T.; Kawaguchi, H.; Kamekura, S.; Ogata, N.; Mori, Y.; Nakamura, K.; Ikegawa, S. und Chung, U. I. (2005): Distinct roles of Sox5, Sox6, and Sox9 in different stages of chondrogenic differentiation, *J Bone Miner Metab* (Band 23), Nr. 5, Seite 337-40. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16133682](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16133682)
- [35] Bi, W.; Deng, J. M.; Zhang, Z.; Behringer, R. R. und de Crombrughe, B. (1999): Sox9 is required for cartilage formation, *Nat Genet* (Band 22), Nr. 1, Seite 85-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10319868](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10319868)
- [36] Lefebvre, V.; Behringer, R. R. und de Crombrughe, B. (2001): L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway, *Osteoarthritis Cartilage* (Band 9 Suppl A), Seite S69-75. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11680692](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11680692)
- [37] Akiyama, H.; Chaboissier, M. C.; Martin, J. F.; Schedl, A. und de Crombrughe, B. (2002): The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6, *Genes Dev* (Band 16), Nr. 21, Seite 2813-28. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12414734](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12414734)
- [38] Vortkamp, A. (2003): *Molekulare Analyse der Skelettentwicklung*, MPI Berlin, Berlin.
- [39] Zhao, Q.; Eberspaecher, H.; Lefebvre, V. und De Crombrughe, B. (1997): Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis, *Dev Dyn* (Band 209), Nr. 4, Seite 377-86. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9264261](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9264261)

- [40] Lefebvre, V.; Huang, W.; Harley, V. R.; Goodfellow, P. N. und de Crombrughe, B. (1997): SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene, *Mol Cell Biol* (Band 17), Nr. 4, Seite 2336-46. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9121483](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9121483)
- [41] Stokes, D. G.; Liu, G.; Dharmavaram, R.; Hawkins, D.; Piera-Velazquez, S. und Jimenez, S. A. (2001): Regulation of type-II collagen gene expression during human chondrocyte de-differentiation and recovery of chondrocyte-specific phenotype in culture involves Sry-type high-mobility-group box (SOX) transcription factors, *Biochem J* (Band 360), Nr. Pt 2, Seite 461-70. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11716775](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11716775)
- [42] Serra, R.; Karaplis, A. und Sohn, P. (1999): Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP)-dependent and -independent effects of transforming growth factor beta (TGF-beta) on endochondral bone formation, *J Cell Biol* (Band 145), Nr. 4, Seite 783-94. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10330406](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10330406)
- [43] Hartmann, C. und Tabin, C. J. (2001): Wnt-14 plays a pivotal role in inducing synovial joint formation in the developing appendicular skeleton, *Cell* (Band 104), Nr. 3, Seite 341-51. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11239392](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11239392)
- [44] Storm, E. E.; Huynh, T. V.; Copeland, N. G.; Jenkins, N. A.; Kingsley, D. M. und Lee, S. J. (1994): Limb alterations in brachypodism mice due to mutations in a new member of the TGF beta-superfamily, *Nature* (Band 368), Nr. 6472, Seite 639-43. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8145850](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8145850)
- [45] Storm, E. E. und Kingsley, D. M. (1999): GDF5 coordinates bone and joint formation during digit development, *Dev Biol* (Band 209), Nr. 1, Seite 11-27. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10208739](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10208739)
- [46] de Crombrughe, B.; Lefebvre, V. und Nakashima, K. (2001): Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation, *Curr Opin Cell Biol* (Band 13), Nr. 6, Seite 721-7. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11698188](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11698188)
- [47] Kim, I. S.; Otto, F.; Zabel, B. und Mundlos, S. (1999): Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1, *Mech Dev* (Band 80), Nr. 2, Seite 159-70. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10072783](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10072783)
- [48] Ueta, C.; Iwamoto, M.; Kanatani, N.; Yoshida, C.; Liu, Y.; Enomoto-Iwamoto, M.; Ohmori, T.; Enomoto, H.; Nakata, K.; Takada, K.; Kurisu, K. und Komori, T. (2001): Skeletal malformations caused by overexpression of Cbfa1 or its dominant negative form in chondrocytes, *J Cell Biol* (Band 153), Nr. 1, Seite 87-100. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11285276](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11285276)
- [49] Stricker, S.; Fundele, R.; Vortkamp, A. und Mundlos, S. (2002): Role of Runx genes in chondrocyte differentiation, *Dev Biol* (Band 245), Nr. 1, Seite 95-108. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11969258](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11969258)
- [50] Schwabe, G. C.; Turkmen, S.; Leschik, G.; Palanduz, S.; Stover, B.; Goecke, T. O. und Mundlos, S. (2004): Brachydactyly type C caused by a homozygous missense mutation in the prodomain of CDMP1, *Am J Med Genet A* (Band 124), Nr. 4, Seite 356-63. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14735582](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14735582)
- [51] Vu, T. H.; Shipley, J. M.; Bergers, G.; Berger, J. E.; Helms, J. A.; Hanahan, D.; Shapiro, S. D.; Senior, R. M. und Werb, Z. (1998): MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes, *Cell* (Band 93), Nr. 3, Seite 411-22. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9590175](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9590175)
- [52] Engsig, M. T.; Chen, Q. J.; Vu, T. H.; Pedersen, A. C.; Therkidsen, B.; Lund, L. R.; Henriksen, K.; Lenhard, T.; Foged, N. T.; Werb, Z. und Delaisse, J. M. (2000): Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones, *J Cell Biol* (Band 151), Nr. 4, Seite 879-89. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11076971](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11076971)

- [53] Zelzer, E.; Glotzer, D. J.; Hartmann, C.; Thomas, D.; Fukai, N.; Soker, S. und Olsen, B. R. (2001): Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1/Runx2, *Mech Dev* (Band 106), Nr. 1-2, Seite 97-106. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11472838](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11472838)
- [54] Vortkamp, A.; Lee, K.; Lanske, B.; Segre, G. V.; Kronenberg, H. M. und Tabin, C. J. (1996): Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein, *Science* (Band 273), Nr. 5275, Seite 613-22. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8662546](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8662546)
- [55] Suva, L. J.; Mather, K. A.; Gillespie, M. T.; Webb, G. C.; Ng, K. W.; Winslow, G. A.; Wood, W. I.; Martin, T. J. und Hudson, P. J. (1989): Structure of the 5' flanking region of the gene encoding human parathyroid-hormone-related protein (PTHrP), *Gene* (Band 77), Nr. 1, Seite 95-105. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2744490](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2744490)
- [56] Mangin, M.; Ikeda, K.; Dreyer, B. E. und Broadus, A. E. (1990): Identification of an up-stream promoter of the human parathyroid hormone-related peptide gene, *Mol Endocrinol* (Band 4), Nr. 6, Seite 851-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2233743](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2233743)
- [57] Vasavada, R. C.; Wysolmerski, J. J.; Broadus, A. E. und Philbrick, W. M. (1993): Identification and characterization of a GC-rich promoter of the human parathyroid hormone-related peptide gene, *Mol Endocrinol* (Band 7), Nr. 2, Seite 273-82. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8469240](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8469240)
- [58] Southby, J.; Murphy, L. M.; Martin, T. J. und Gillespie, M. T. (1996): Cell-specific and regulator-induced promoter usage and messenger ribonucleic acid splicing for parathyroid hormone-related protein, *Endocrinology* (Band 137), Nr. 4, Seite 1349-57. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8625910](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8625910)
- [59] Richard, V.; Luchin, A.; Brena, R. M.; Plass, C. und Rosol, T. J. (2003): Quantitative evaluation of alternative promoter usage and 3' splice variants for parathyroid hormone-related protein by real-time reverse transcription-PCR, *Clin Chem* (Band 49), Nr. 8, Seite 1398-402. URL:



- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12881458](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12881458)
- [60] Campos, R. V.; Wang, C. und Drucker, D. J. (1992): Regulation of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) gene transcription: cell- and tissue-specific promoter utilization mediated by multiple positive and negative cis-acting DNA elements, *Mol Endocrinol* (Band 6), Nr. 10, Seite 1642-52. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1280327](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1280327)
- [61] <http://www.expasy.ch/sprot/> (2005): PTHLH, 2005, 20.09., 08.11.05, **Electronic Database, PTHLH**, <http://www.expasy.ch/sprot/>
- [62] Schipani, E. und Provot, S. (2003): PTHrP, PTH, and the PTH/PTHrP receptor in endochondral bone development, *Birth Defects Res C Embryo Today* (Band 69), Nr. 4, Seite 352-62. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14745975](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14745975)
- [63] van Donkelaar, C. C. und Huiskes, R. (2007): The PTHrP-Ihh feedback loop in the embryonic growth plate allows PTHrP to control hypertrophy and Ihh to regulate proliferation, *Biomech Model Mechanobiol* (Band 6), Nr. 1-2, Seite 55-62. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16691414](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16691414)
- [64] Hickok, N. J.; Haas, A. R. und Tuan, R. S. (1998): Regulation of chondrocyte differentiation and maturation, *Microsc Res Tech* (Band 43), Nr. 2, Seite 174-90. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9823003](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9823003)
- [65] Chung, U. I.; Schipani, E.; McMahon, A. P. und Kronenberg, H. M. (2001): Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development, *J Clin Invest* (Band 107), Nr. 3, Seite 295-304. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11160153](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11160153)
- [66] Bitgood, M. J. und McMahon, A. P. (1995): Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo, *Dev Biol* (Band 172), Nr. 1, Seite 126-38. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7589793](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7589793)
- [67] Chung, U. I.; Lanske, B.; Lee, K.; Li, E. und Kronenberg, H. (1998): The parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor coordinates endochondral



- bone development by directly controlling chondrocyte differentiation, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 95), Nr. 22, Seite 13030-5. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9789035](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9789035)
- [68] St-Jacques, B.; Hammerschmidt, M. und McMahon, A. P. (1999): Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation, Genes Dev (Band 13), Nr. 16, Seite 2072-86. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10465785](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10465785)
- [69] Long, F.; Zhang, X. M.; Karp, S.; Yang, Y. und McMahon, A. P. (2001): Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation, Development (Band 128), Nr. 24, Seite 5099-108. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11748145](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11748145)
- [70] Provot, S. und Schipani, E. (2005): Molecular mechanisms of endochondral bone development, Biochem Biophys Res Commun (Band 328), Nr. 3, Seite 658-65. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15694399](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15694399)
- [71] Koziel, L.; Wuelling, M.; Schneider, S. und Vortkamp, A. (2005): Gli3 acts as a repressor downstream of Ihh in regulating two distinct steps of chondrocyte differentiation, Development (Band 132), Nr. 23, Seite 5249-60. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16284117](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16284117)
- [72] Ornitz, D. M. und Marie, P. J. (2002): FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease, Genes Dev (Band 16), Nr. 12, Seite 1446-65. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12080084](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12080084)
- [73] Minina, E.; Kreschel, C.; Naski, M. C.; Ornitz, D. M. und Vortkamp, A. (2002): Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation, Dev Cell (Band 3), Nr. 3, Seite 439-49. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12361605](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12361605)
- [74] Minina, E.; Wenzel, H. M.; Kreschel, C.; Karp, S.; Gaffield, W.; McMahon, A. P. und Vortkamp, A. (2001): BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate

- chondrocyte proliferation and differentiation, *Development* (Band 128), Nr. 22, Seite 4523-34. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11714677](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11714677)
- [75] Hurle, J. M.; Ros, M. A.; Garcia-Martinez, V.; Macias, D. und Ganan, Y. (1995): Cell death in the embryonic developing limb, *Scanning Microsc* (Band 9), Nr. 2, Seite 519-33; discussion 533-4. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8714747](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8714747)
- [76] Hurle, J. M.; Ros, M. A.; Climent, V. und Garcia-Martinez, V. (1996): Morphology and significance of programmed cell death in the developing limb bud of the vertebrate embryo, *Microsc Res Tech* (Band 34), Nr. 3, Seite 236-46. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8743411](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8743411)
- [77] Ashique, A. M.; Fu, K. und Richman, J. M. (2002): Signalling via type IA and type IB bone morphogenetic protein receptors (BMPR) regulates intramembranous bone formation, chondrogenesis and feather formation in the chicken embryo, *Int J Dev Biol* (Band 46), Nr. 2, Seite 243-53. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11934153](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11934153)
- [78] Ikeda, T.; Takahashi, H.; Suzuki, A.; Ueno, N.; Yokose, S.; Yamaguchi, A. und Yoshiki, S. (1996): Cloning of rat type I receptor cDNA for bone morphogenetic protein-2 and bone morphogenetic protein-4, and the localization compared with that of the ligands, *Dev Dyn* (Band 206), Nr. 3, Seite 318-29. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8896987](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8896987)
- [79] Zou, H. und Niswander, L. (1996): Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation, *Science* (Band 272), Nr. 5262, Seite 738-41. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8614838](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8614838)
- [80] Macias, D.; Ganan, Y.; Rodriguez-Leon, J.; Merino, R. und Hurle, J. M. (1999): Regulation by members of the transforming growth factor beta superfamily of the digital and interdigital fates of the autopodial limb mesoderm, *Cell Tissue Res* (Band 296), Nr. 1, Seite 95-102. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10199969](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10199969)

- [81] Ganan, Y.; Macias, D.; Duterque-Coquillaud, M.; Ros, M. A. und Hurle, J. M. (1996): Role of TGF beta s and BMPs as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in the developing chick limb autopod, *Development* (Band 122), Nr. 8, Seite 2349-57. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8756280](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8756280)
- [82] Merino, R.; Ganan, Y.; Macias, D.; Economides, A. N.; Sampath, K. T. und Hurle, J. M. (1998): Morphogenesis of digits in the avian limb is controlled by FGFs, TGFbetas, and noggin through BMP signaling, *Dev Biol* (Band 200), Nr. 1, Seite 35-45. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9698454](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9698454)
- [83] Zimmerman, L. B.; De Jesus-Escobar, J. M. und Harland, R. M. (1996): The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4, *Cell* (Band 86), Nr. 4, Seite 599-606. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8752214](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8752214)
- [84] Zakany, J.; Fromental-Ramain, C.; Warot, X. und Duboule, D. (1997): Regulation of number and size of digits by posterior Hox genes: a dose-dependent mechanism with potential evolutionary implications, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 94), Nr. 25, Seite 13695-700. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9391088](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9391088)
- [85] Monge, I.; Kondo, T. und Duboule, D. (2003): An enhancer-titration effect induces digit-specific regulatory alleles of the HoxD cluster, *Dev Biol* (Band 256), Nr. 2, Seite 212-20. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12679098](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12679098)
- [86] Spitz, F.; Gonzalez, F. und Duboule, D. (2003): A global control region defines a chromosomal regulatory landscape containing the HoxD cluster, *Cell* (Band 113), Nr. 3, Seite 405-17. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12732147](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12732147)
- [87] Merino, R.; Macias, D.; Ganan, Y.; Rodriguez-Leon, J.; Economides, A. N.; Rodriguez-Esteban, C.; Izpisua-Belmonte, J. C. und Hurle, J. M. (1999): Control of digit formation by activin signalling, *Development* (Band 126), Nr. 10, Seite 2161-70. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10207141](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10207141)
- [88] Stern, C. D.; Yu, R. T.; Kakizuka, A.; Kintner, C. R.; Mathews, L. S.; Vale, W. W.; Evans, R. M. und Umesono, K. (1995): Activin and its receptors during gastrulation and the later phases of mesoderm development in the chick embryo, *Dev Biol* (Band 172), Nr. 1, Seite 192-205. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7589799](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7589799)
- [89] Mundlos, S. und Olsen, B. R. (1997): Heritable diseases of the skeleton. Part II: Molecular insights into skeletal development-matrix components and their homeostasis, *Faseb J* (Band 11), Nr. 4, Seite 227-33. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9068611](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9068611)
- [90] **CSMC (2002): International Nomenclature of Constitutional Disorders of Bone Osteochondrodysplasias, <http://www.csmc.edu/genetics/skeletdys>, 15.08.2005, Class**
- [91] Mundlos, S. und Olsen, B. R. (1997): Heritable diseases of the skeleton. Part I: Molecular insights into skeletal development-transcription factors and signaling pathways, *Faseb J* (Band 11), Nr. 2, Seite 125-32. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9039954](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9039954)
- [92] Hall, C. M. (2002): International nosology and classification of constitutional disorders of bone (2001), *Am J Med Genet* (Band 113), Nr. 1, Seite 65-77. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12400068](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12400068)
- [93] Schwabe, G. C. und Mundlos, S. (2004): Genetics of congenital hand anomalies, *Handchir Mikrochir Plast Chir* (Band 36), Nr. 2-3, Seite 85-97. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15162306](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15162306)
- [94] Mundlos, S. (2001): Defects of human skeletogenesis--models and mechanisms, *Novartis Found Symp* (Band 232), Seite 81-91; discussion 91-101. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11277089](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11277089)
- [95] **(2002): International Nomenclature of Constitutional Disorders of Bone Osteochondrodysplasias, <http://www.csmc.edu/genetics/skeletdys>, 15.08.2005**

- [96] Superti-Furga, A.; Bonafe, L. und Rimoin, D. L. (2001): Molecular-pathogenetic classification of genetic disorders of the skeleton, *Am J Med Genet* (Band 106), Nr. 4, Seite 282-93. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11891680](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11891680)
- [97] Bell, Julia (1951): Brachydactyly and symphalangism, Penrose, L.S., *The treasury of human inheritance* (Band 5: Hereditary digital anomalies) Seite 1-31, University of Cambridge Press, Cambridge.
- [98] Hortling, H.; Puupponen, E. und Koski, K. (1960): Short-metacarpal or metatarsal bones: pseudo-pseudohypoparathyroidism, *J Clin Endocrinol Metab* (Band 20), Seite 466-72. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14403231](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14403231)
- [99] McKusick, V. A. und Milch, R. A. (1964): The clinical behavior of genetic disease: selected aspects, *Clin Orthop Relat Res* (Band 33), Seite 22-39. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=5889024](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=5889024)
- [100] Daluiski, A.; Yi, S. E. und Lyons, K. M. (2001): The molecular control of upper extremity development: implications for congenital hand anomalies, *J Hand Surg [Am]* (Band 26), Nr. 1, Seite 8-22. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11172363](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11172363)
- [101] Gao, B. und He, L. (2004): Answering a century old riddle: brachydactyly type A1, *Cell Res* (Band 14), Nr. 3, Seite 179-87. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15225411](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15225411)
- [102] Lehmann, K.; Seemann, P.; Stricker, S.; Sammar, M.; Meyer, B.; Suring, K.; Majewski, F.; Tinschert, S.; Grzeschik, K. H.; Muller, D.; Knaus, P.; Nurnberg, P. und Mundlos, S. (2003): Mutations in bone morphogenetic protein receptor 1B cause brachydactyly type A2, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 100), Nr. 21, Seite 12277-82. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14523231](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14523231)
- [103] Seemann, P.; Schwappacher, R.; Kjaer, K. W.; Krakow, D.; Lehmann, K.; Dawson, K.; Stricker, S.; Pohl, J.; Ploger, F.; Staub, E.; Nickel, J.; Sebald, W.; Knaus, P. und Mundlos, S. (2005): Activating and deactivating mutations in the receptor interaction

- site of GDF5 cause symphalangism or brachydactyly type A2, J Clin Invest (Band 115), Nr. 9, Seite 2373-81. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16127465](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16127465)
- [104] Niedermaier, M.; Schwabe, G. C.; Fees, S.; Helmrich, A.; Brieske, N.; Seemann, P.; Hecht, J.; Seitz, V.; Stricker, S.; Leschik, G.; Schrock, E.; Selby, P. B. und Mundlos, S. (2005): An inversion involving the mouse Shh locus results in brachydactyly through dysregulation of Shh expression, J Clin Invest (Band 115), Nr. 4, Seite 900-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15841179](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15841179)
- [105] Sammar, M.; Stricker, S.; Schwabe, G. C.; Sieber, C.; Hartung, A.; Hanke, M.; Oishi, I.; Pohl, J.; Minami, Y.; Sebald, W.; Mundlos, S. und Knaus, P. (2004): Modulation of GDF5/BRI-b signalling through interaction with the tyrosine kinase receptor Ror2, Genes Cells (Band 9), Nr. 12, Seite 1227-38. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15569154](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15569154)
- [106] Schwabe, G. C.; Tinschert, S.; Buschow, C.; Meinecke, P.; Wolff, G.; Gillesen-Kaesbach, G.; Oldridge, M.; Wilkie, A. O.; Komec, R. und Mundlos, S. (2000): Distinct mutations in the receptor tyrosine kinase gene ROR2 cause brachydactyly type B, Am J Hum Genet (Band 67), Nr. 4, Seite 822-31. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10986040](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10986040)
- [107] Oldridge, M.; Fortuna, A. M.; Maringa, M.; Propping, P.; Mansour, S.; Pollitt, C.; DeChiara, T. M.; Kimble, R. B.; Valenzuela, D. M.; Yancopoulos, G. D. und Wilkie, A. O. (2000): Dominant mutations in ROR2, encoding an orphan receptor tyrosine kinase, cause brachydactyly type B, Nat Genet (Band 24), Nr. 3, Seite 275-8. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10700182](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10700182)
- [108] Polinkovsky, A.; Robin, N. H.; Thomas, J. T.; Irons, M.; Lynn, A.; Goodman, F. R.; Reardon, W.; Kant, S. G.; Brunner, H. G.; van der Burgt, I.; Chitayat, D.; McGaughan, J.; Donnai, D.; Luyten, F. P. und Warman, M. L. (1997): Mutations in CDMP1 cause autosomal dominant brachydactyly type C, Nat Genet (Band 17), Nr. 1, Seite 18-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9288091](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9288091)

- [109] Polymeropoulos, M. H.; Ide, S. E.; Magyari, T. und Francomano, C. A. (1996): Brachydactyly type C gene maps to human chromosome 12q24, *Genomics* (Band 38), Nr. 1, Seite 45-50. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8954778](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8954778)
- [110] Johnson, D.; Kan, S. H.; Oldridge, M.; Trembath, R. C.; Roche, P.; Esnouf, R. M.; Giele, H. und Wilkie, A. O. (2003): Missense mutations in the homeodomain of HOXD13 are associated with brachydactyly types D and E, *Am J Hum Genet* (Band 72), Nr. 4, Seite 984-97. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12649808](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12649808)
- [111] Tabin, C. J. (1992): Why we have (only) five fingers per hand: hox genes and the evolution of paired limbs, *Development* (Band 116), Nr. 2, Seite 289-96. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1363084](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1363084)
- [112] Muragaki, Y.; Mundlos, S.; Upton, J. und Olsen, B. R. (1996): Altered growth and branching patterns in synpolydactyly caused by mutations in HOXD13, *Science* (Band 272), Nr. 5261, Seite 548-51. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8614804](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8614804)
- [113] Giardino, D.; Finelli, P.; Gottardi, G.; De Canal, G.; Della Monica, M.; Lonardo, F.; Scarano, G. und Larizza, L. (2003): Narrowing the candidate region of Albright hereditary osteodystrophy-like syndrome by deletion mapping in a patient with an unbalanced cryptic translocation t(2;6)(q37.3;q26), *Am J Med Genet A* (Band 122), Nr. 3, Seite 261-5. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12966529](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12966529)
- [114] Shrimpton, A. E.; Braddock, B. R.; Thomson, L. L.; Stein, C. K. und Hoo, J. J. (2004): Molecular delineation of deletions on 2q37.3 in three cases with an Albright hereditary osteodystrophy-like phenotype, *Clin Genet* (Band 66), Nr. 6, Seite 537-44. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15521982](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15521982)
- [115] Bähring, S.; Rauch, A.; Toka, O.; Schroeder, C.; Hesse, C.; Siedler, H.; Fesus, G.; Haefeli, W. E.; Busjahn, A.; Aydin, A.; Neuenfeld, Y.; Muhl, A.; Toka, H. R.; Gollasch, M.; Jordan, J. und Luft, F. C. (2004): Autosomal-dominant hypertension with type E



- brachydactyly is caused by rearrangement on the short arm of chromosome 12, Hypertension (Band 43), Nr. 2, Seite 471-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14707163](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14707163)
- [116] Schuster, H.; Wienker, T. E.; Bahring, S.; Bilginturan, N.; Toka, H. R.; Neitzel, H.; Jeschke, E.; Toka, O.; Gilbert, D.; Lowe, A.; Ott, J.; Haller, H. und Luft, F. C. (1996): Severe autosomal dominant hypertension and brachydactyly in a unique Turkish kindred maps to human chromosome 12, Nat Genet (Band 13), Nr. 1, Seite 98-100. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8673114](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8673114)
- [117] Toka, H. R.; Bahring, S.; Chitayat, D.; Melby, J. C.; Whitehead, R.; Jeschke, E.; Wienker, T. F.; Toka, O.; Schuster, H. und Luft, F. C. (1998): Families with autosomal dominant brachydactyly type E, short stature, and severe hypertension, Ann Intern Med (Band 129), Nr. 3, Seite 204-8. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9696728](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9696728)
- [118] Levine, M. A.; Ahn, T. G.; Klupt, S. F.; Kaufman, K. D.; Smallwood, P. M.; Bourne, H. R.; Sullivan, K. A. und Van Dop, C. (1988): Genetic deficiency of the alpha subunit of the guanine nucleotide-binding protein Gs as the molecular basis for Albright hereditary osteodystrophy, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 85), Nr. 2, Seite 617-21. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2829196](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2829196)
- [119] Patten, J. L.; Johns, D. R.; Valle, D.; Eil, C.; Gruppuso, P. A.; Steele, G.; Smallwood, P. M. und Levine, M. A. (1990): Mutation in the gene encoding the stimulatory G protein of adenylate cyclase in Albright's hereditary osteodystrophy, N Engl J Med (Band 322), Nr. 20, Seite 1412-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2109828](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2109828)
- [120] Weinstein, L. S.; Gejman, P. V.; Friedman, E.; Kadowaki, T.; Collins, R. M.; Gershon, E. S. und Spiegel, A. M. (1990): Mutations of the Gs alpha-subunit gene in Albright hereditary osteodystrophy detected by denaturing gradient gel electrophoresis, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 87), Nr. 21, Seite 8287-90. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2122458](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2122458)



- [121] Liu, J.; Erlichman, B. und Weinstein, L. S. (2003): The stimulatory G protein alpha-subunit Gs alpha is imprinted in human thyroid glands: implications for thyroid function in pseudohypoparathyroidism types 1A and 1B, *J Clin Endocrinol Metab* (Band 88), Nr. 9, Seite 4336-41. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=12970307](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12970307)
- [122] Hedeland, H.; Berntorp, K.; Arheden, K. und Kristoffersson, U. (1992): Pseudohypoparathyroidism type I and Albright's hereditary osteodystrophy with a proximal 15q chromosomal deletion in mother and daughter, *Clin Genet* (Band 42), Nr. 3, Seite 129-34. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=1356667](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=1356667)
- [123] Johnston, J. J.; Olivos-Glander, I.; Killoran, C.; Elson, E.; Turner, J. T.; Peters, K. F.; Abbott, M. H.; Aughton, D. J.; Aylsworth, A. S.; Bamshad, M. J.; Booth, C.; Curry, C. J.; David, A.; Dinulos, M. B.; Flannery, D. B.; Fox, M. A.; Graham, J. M.; Grange, D. K.; Guttmacher, A. E.; Hannibal, M. C.; Henn, W.; Hennekam, R. C.; Holmes, L. B.; Hoyme, H. E.; Leppig, K. A.; Lin, A. E.; Macleod, P.; Manchester, D. K.; Marcelis, C.; Mazzanti, L.; McCann, E.; McDonald, M. T.; Mendelsohn, N. J.; Moeschler, J. B.; Moghaddam, B.; Neri, G.; Newbury-Ecob, R.; Pagon, R. A.; Phillips, J. A.; Sadler, L. S.; Stoler, J. M.; Tilstra, D.; Walsh Vockley, C. M.; Zackai, E. H.; Zadeh, T. M.; Brueton, L.; Black, G. C. und Biesecker, L. G. (2005): Molecular and clinical analyses of Greig cephalopolysyndactyly and Pallister-Hall syndromes: robust phenotype prediction from the type and position of GLI3 mutations, *Am J Hum Genet* (Band 76), Nr. 4, Seite 609-22. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=15739154](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15739154)
- [124] Mau, E.; Whetstone, H.; Yu, C.; Hopyan, S.; Wunder, J. S. und Alman, B. A. (2007): PTHrP regulates growth plate chondrocyte differentiation and proliferation in a Gli3 dependent manner utilizing hedgehog ligand dependent and independent mechanisms, *Dev Biol*. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=17328886](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=17328886)
- [125] Weir, E. C.; Philbrick, W. M.; Amling, M.; Neff, L. A.; Baron, R. und Broadus, A. E. (1996): Targeted overexpression of parathyroid hormone-related peptide in chondrocytes causes chondrodysplasia and delayed endochondral bone formation, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 93), Nr. 19, Seite 10240-5. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8816783](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8816783)
- [126] Kovacs, C. S.; Chafe, L. L.; Fudge, N. J.; Friel, J. K. und Manley, N. R. (2001): PTH regulates fetal blood calcium and skeletal mineralization independently of PTHrP, *Endocrinology* (Band 142), Nr. 11, Seite 4983-93. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11606467](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11606467)
- [127] Karaplis, A. C.; Luz, A.; Glowacki, J.; Bronson, R. T.; Tybulewicz, V. L.; Kronenberg, H. M. und Mulligan, R. C. (1994): Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene, *Genes Dev* (Band 8), Nr. 3, Seite 277-89. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8314082](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8314082)
- [128] Haber, J. E. (2000): Recombination: a frank view of exchanges and vice versa, *Curr Opin Cell Biol* (Band 12), Nr. 3, Seite 286-92. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10801454](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10801454)
- [129] ISCN (1985): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (1985) ISCN 1985. Report of the Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature, *Birth Defects Orig Artic Ser* (Band 21), Nr. 1, Seite 1-117. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=4041569](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4041569)
- [130] Strachan T., Read A.P. (1996): *Molekulare Humangenetik* (Band 1. Auflage), Spektrum Akademischer Verlag.
- [131] Rose, D.; Thomas, W. und Holm, C. (1990): Segregation of recombined chromosomes in meiosis I requires DNA topoisomerase II, *Cell* (Band 60), Nr. 6, Seite 1009-17. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2156624](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2156624)
- [132] Spitzner, J. R. und Muller, M. T. (1988): A consensus sequence for cleavage by vertebrate DNA topoisomerase II, *Nucleic Acids Res* (Band 16), Nr. 12, Seite 5533-56. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2838820](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2838820)
- [133] Holm, C.; Goto, T.; Wang, J. C. und Botstein, D. (1985): DNA topoisomerase II is required at the time of mitosis in yeast, *Cell* (Band 41), Nr. 2, Seite 553-63. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2985283](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2985283)
- [134] Zechiedrich, E. L. und Osheroff, N. (1990): Eukaryotic topoisomerases recognize nucleic acid topology by preferentially interacting with DNA crossovers, *Embo J* (Band 9), Nr. 13, Seite 4555-62. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2176156](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2176156)
- [135] Burden, D. A. und Osheroff, N. (1998): Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme, *Biochim Biophys Acta* (Band 1400), Nr. 1-3, Seite 139-54. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9748545](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9748545)
- [136] Muller, M. T.; Spitzner, J. R.; DiDonato, J. A.; Mehta, V. B.; Tsutsui, K. und Tsutsui, K. (1988): Single-strand DNA cleavages by eukaryotic topoisomerase II, *Biochemistry* (Band 27), Nr. 22, Seite 8369-79. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2853964](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2853964)
- [137] Gupta, G. D.; Makde, R. D.; Kamdar, R. P.; D'Souza, J. S.; Kulkarni, M. G.; Kumar, V. und Rao, B. J. (2005): Co-expressed recombinant human Translin-Trax complex binds DNA, *FEBS Lett* (Band 579), Nr. 14, Seite 3141-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15919079](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15919079)
- [138] Chennathukuzhi, V. M.; Kurihara, Y.; Bray, J. D. und Hecht, N. B. (2001): Trax (translin-associated factor X), a primarily cytoplasmic protein, inhibits the binding of TB-RBP (translin) to RNA, *J Biol Chem* (Band 276), Nr. 16, Seite 13256-63. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11278549](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11278549)
- [139] Aoki, K.; Suzuki, K.; Sugano, T.; Tasaka, T.; Nakahara, K.; Kuge, O.; Omori, A. und Kasai, M. (1995): A novel gene, Translin, encodes a recombination hotspot binding protein associated with chromosomal translocations, *Nat Genet* (Band 10), Nr. 2, Seite 167-74. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7663511](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7663511)
- [140] Kasai, M.; Matsuzaki, T.; Katayanagi, K.; Omori, A.; Maziarz, R. T.; Strominger, J. L.; Aoki, K. und Suzuki, K. (1997): The translin ring specifically recognizes DNA ends at recombination hot spots in the human genome, *J Biol Chem* (Band 272), Nr. 17, Seite

- 11402-7. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9111049](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9111049)
- [141] Sengupta, K. und Rao, B. J. (2002): Translin binding to DNA: recruitment through DNA ends and consequent conformational transitions, *Biochemistry* (Band 41), Nr. 51, Seite 15315-26. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12484770](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12484770)
- [142] Wei, Y.; Sun, M.; Nilsson, G.; Dwight, T.; Xie, Y.; Wang, J.; Hou, Y.; Larsson, O.; Larsson, C. und Zhu, X. (2003): Characteristic sequence motifs located at the genomic breakpoints of the translocation t(X;18) in synovial sarcomas, *Oncogene* (Band 22), Nr. 14, Seite 2215-22. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12687023](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12687023)
- [143] Hosaka, T.; Kanoe, H.; Nakayama, T.; Murakami, H.; Yamamoto, H.; Nakamata, T.; Tsuboyama, T.; Oka, M.; Kasai, M.; Sasaki, M. S.; Nakamura, T. und Toguchida, J. (2000): Translin binds to the sequences adjacent to the breakpoints of the TLS and CHOP genes in liposarcomas with translocation t(12;6), *Oncogene* (Band 19), Nr. 50, Seite 5821-5. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11126370](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11126370)
- [144] Kanoe, H.; Nakayama, T.; Hosaka, T.; Murakami, H.; Yamamoto, H.; Nakashima, Y.; Tsuboyama, T.; Nakamura, T.; Ron, D.; Sasaki, M. S. und Toguchida, J. (1999): Characteristics of genomic breakpoints in TLS-CHOP translocations in liposarcomas suggest the involvement of Translin and topoisomerase II in the process of translocation, *Oncogene* (Band 18), Nr. 3, Seite 721-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9989822](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9989822)
- [145] Lovett, B. D.; Lo Nigro, L.; Rappaport, E. F.; Blair, I. A.; Osherooff, N.; Zheng, N.; Megonigal, M. D.; Williams, W. R.; Nowell, P. C. und Felix, C. A. (2001): Near-precise interchromosomal recombination and functional DNA topoisomerase II cleavage sites at MLL and AF-4 genomic breakpoints in treatment-related acute lymphoblastic leukemia with t(4;11) translocation, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 98), Nr. 17, Seite 9802-7. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11493704](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11493704)

- [146] Obata, K.; Hiraga, H.; Nojima, T.; Yoshida, M. C. und Abe, S. (1999): Molecular characterization of the genomic breakpoint junction in a t(11;22) translocation in Ewing sarcoma, *Genes Chromosomes Cancer* (Band 25), Nr. 1, Seite 6-15. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10221334](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10221334)
- [147] Chalk, J. G.; Barr, F. G. und Mitchell, C. D. (1997): Translin recognition site sequences flank chromosome translocation breakpoints in alveolar rhabdomyosarcoma cell lines, *Oncogene* (Band 15), Nr. 10, Seite 1199-205. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9294613](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9294613)
- [148] Panagopoulos, I.; Lassen, C.; Isaksson, M.; Mitelman, F.; Mandahl, N. und Aman, P. (1997): Characteristic sequence motifs at the breakpoints of the hybrid genes FUS/CHOP, EWS/CHOP and FUS/ERG in myxoid liposarcoma and acute myeloid leukemia, *Oncogene* (Band 15), Nr. 11, Seite 1357-62. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9315104](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9315104)
- [149] Zhang, J. G.; Goldman, J. M. und Cross, N. C. (1995): Characterization of genomic BCR-ABL breakpoints in chronic myeloid leukaemia by PCR, *Br J Haematol* (Band 90), Nr. 1, Seite 138-46. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7786776](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7786776)
- [150] Gajecka, M.; Pavliceck, A.; Glotzbach, C. D.; Ballif, B. C.; Jarmuz, M.; Jurka, J. und Shaffer, L. G. (2006): Identification of sequence motifs at the breakpoint junctions in three t(1;9)(p36.3;q34) and delineation of mechanisms involved in generating balanced translocations, *Hum Genet* (Band 120), Nr. 4, Seite 519-26. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16847692](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16847692)
- [151] Breathnach, R. und Chambon, P. (1981): Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins, *Annu Rev Biochem* (Band 50), Seite 349-83. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6791577](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6791577)
- [152] Lagrange, T.; Kim, T. K.; Orphanides, G.; Ebright, Y. W.; Ebright, R. H. und Reinberg, D. (1996): High-resolution mapping of nucleoprotein complexes by site-specific protein-DNA photocrosslinking: organization of the human TBP-TFIIA-TFIIB-DNA quaternary complex, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 93), Nr. 20, Seite 10620-5. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8855228](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8855228)
- [153] Lagrange, T.; Kapanidis, A. N.; Tang, H.; Reinberg, D. und Ebricht, R. H. (1998): New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB, *Genes Dev* (Band 12), Nr. 1, Seite 34-44. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9420329](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9420329)
- [154] Fassler, J. S. und Gussin, G. N. (1996): Promoters and basal transcription machinery in eubacteria and eukaryotes: concepts, definitions, and analogies, *Methods Enzymol* (Band 273), Seite 3-29. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8791596](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8791596)
- [155] Orphanides, G.; Lagrange, T. und Reinberg, D. (1996): The general transcription factors of RNA polymerase II, *Genes Dev* (Band 10), Nr. 21, Seite 2657-83. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8946909](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8946909)
- [156] Suske, G. (1999): The Sp-family of transcription factors, *Gene* (Band 238), Nr. 2, Seite 291-300. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10570957](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10570957)
- [157] Bucher, P. (1990): Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences, *J Mol Biol* (Band 212), Nr. 4, Seite 563-78. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2329577](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2329577)
- [158] Vavouri, T.; McEwen, G. K.; Woolfe, A.; Gilks, W. R. und Elgar, G. (2006): Defining a genomic radius for long-range enhancer action: duplicated conserved non-coding elements hold the key, *Trends Genet* (Band 22), Nr. 1, Seite 5-10. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16290136](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16290136)
- [159] Vavouri, T. und Elgar, G. (2005): Prediction of cis-regulatory elements using binding site matrices--the successes, the failures and the reasons for both, *Curr Opin Genet Dev* (Band 15), Nr. 4, Seite 395-402. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15950456](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15950456)

- [160] Vavouri, T.; Walter, K.; Gilks, W. R.; Lehner, B. und Elgar, G. (2007): Parallel evolution of conserved non-coding elements that target a common set of developmental regulatory genes from worms to humans, *Genome Biol* (Band 8), Nr. 2, Seite R15. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17274809](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17274809)
- [161] Odom, D. T.; Dowell, R. D.; Jacobsen, E. S.; Gordon, W.; Danford, T. W.; MacIsaac, K. D.; Rolfe, P. A.; Conboy, C. M.; Gifford, D. K. und Fraenkel, E. (2007): Tissue-specific transcriptional regulation has diverged significantly between human and mouse, *Nat Genet* (Band 39), Nr. 6, Seite 730-2. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17529977](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17529977)
- [162] Vignali, M.; Hassan, A. H.; Neely, K. E. und Workman, J. L. (2000): ATP-dependent chromatin-remodeling complexes, *Mol Cell Biol* (Band 20), Nr. 6, Seite 1899-910. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10688638](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10688638)
- [163] Berger, S. L. (2002): Histone modifications in transcriptional regulation, *Curr Opin Genet Dev* (Band 12), Nr. 2, Seite 142-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11893486](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11893486)
- [164] Schubeler, D.; Francastel, C.; Cimbora, D. M.; Reik, A.; Martin, D. I. und Groudine, M. (2000): Nuclear localization and histone acetylation: a pathway for chromatin opening and transcriptional activation of the human beta-globin locus, *Genes Dev* (Band 14), Nr. 8, Seite 940-50. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10783166](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10783166)
- [165] Weintraub, H. und Groudine, M. (1976): Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation, *Science* (Band 193), Nr. 4256, Seite 848-56. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=948749](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=948749)
- [166] Tolhuis, B.; Palstra, R. J.; Splinter, E.; Grosveld, F. und de Laat, W. (2002): Looping and interaction between hypersensitive sites in the active beta-globin locus, *Mol Cell* (Band 10), Nr. 6, Seite 1453-65. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12504019](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12504019)



- [167] Wang, J. C. und Giaeever, G. N. (1988): Action at a distance along a DNA, Science (Band 240), Nr. 4850, Seite 300-4. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3281259](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3281259)
- [168] Rippe, K.; von Hippel, P. H. und Langowski, J. (1995): Action at a distance: DNA-looping and initiation of transcription, Trends Biochem Sci (Band 20), Nr. 12, Seite 500-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8571451](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8571451)
- [169] Ptashne, M. und Gann, A. (1997): Transcriptional activation by recruitment, Nature (Band 386), Nr. 6625, Seite 569-77. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9121580](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9121580)
- [170] Liu, Z. und Garrard, W. T. (2005): Long-range interactions between three transcriptional enhancers, active  $\kappa$  gene promoters, and a 3' boundary sequence spanning 46 kilobases, Mol Cell Biol (Band 25), Nr. 8, Seite 3220-31. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15798207](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15798207)
- [171] Ringrose, L.; Chabanis, S.; Angrand, P. O.; Woodroffe, C. und Stewart, A. F. (1999): Quantitative comparison of DNA looping in vitro and in vivo: chromatin increases effective DNA flexibility at short distances, Embo J (Band 18), Nr. 23, Seite 6630-41. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10581237](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10581237)
- [172] Blackwood, E. M. und Kadonaga, J. T. (1998): Going the distance: a current view of enhancer action, Science (Band 281), Nr. 5373, Seite 60-3. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9679020](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9679020)
- [173] Bulger, M. und Groudine, M. (1999): Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation, Genes Dev (Band 13), Nr. 19, Seite 2465-77. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10521391](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10521391)
- [174] Gaszner, M. und Felsenfeld, G. (2006): Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms, Nat Rev Genet (Band 7), Nr. 9, Seite 703-13. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16909129](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16909129)



- [175] Zhao, H. und Dean, A. (2005): Organizing the genome: enhancers and insulators, *Biochem Cell Biol* (Band 83), Nr. 4, Seite 516-24. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16094455](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16094455)
- [176] West, A. G. und Fraser, P. (2005): Remote control of gene transcription, *Hum Mol Genet* (Band 14 Spec No 1), Seite R101-11. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15809261](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15809261)
- [177] West, A. G.; Gaszner, M. und Felsenfeld, G. (2002): Insulators: many functions, many mechanisms, *Genes Dev* (Band 16), Nr. 3, Seite 271-88. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11825869](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11825869)
- [178] Farrell, C. M.; West, A. G. und Felsenfeld, G. (2002): Conserved CTCF insulator elements flank the mouse and human beta-globin loci, *Mol Cell Biol* (Band 22), Nr. 11, Seite 3820-31. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11997516](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11997516)
- [179] Lutz, M.; Burke, L. J.; LeFevre, P.; Myers, F. A.; Thorne, A. W.; Crane-Robinson, C.; Bonifer, C.; Filippova, G. N.; Lobanenko, V. und Renkawitz, R. (2003): Thyroid hormone-regulated enhancer blocking: cooperation of CTCF and thyroid hormone receptor, *Embo J* (Band 22), Nr. 7, Seite 1579-87. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12660164](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12660164)
- [180] Bell, A. C. und Felsenfeld, G. (2000): Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *Igf2* gene, *Nature* (Band 405), Nr. 6785, Seite 482-5. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10839546](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10839546)
- [181] Valadez-Graham, V.; Razin, S. V. und Recillas-Targa, F. (2004): CTCF-dependent enhancer blockers at the upstream region of the chicken alpha-globin gene domain, *Nucleic Acids Res* (Band 32), Nr. 4, Seite 1354-62. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14981153](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14981153)
- [182] Kleinjan, D. A. und van Heyningen, V. (2005): Long-range control of gene expression: emerging mechanisms and disruption in disease, *Am J Hum Genet* (Band 76), Nr. 1, Seite 8-32. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15549674](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15549674)
- [183] Frazer, K. A.; Pachter, L.; Poliakov, A.; Rubin, E. M. und Dubchak, I. (2004): VISTA: computational tools for comparative genomics, *Nucleic Acids Res* (Band 32), Nr. Web Server issue, Seite W273-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15215394](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15215394)
- [184] Liu, J. und Francke, U. (2006): Identification of cis-regulatory elements for MECP2 expression, *Hum Mol Genet* (Band 15), Nr. 11, Seite 1769-82. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16613900](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16613900)
- [185] Abbasi, A. A.; Paparidis, Z.; Malik, S.; Goode, D. K.; Callaway, H.; Elgar, G. und Grzeschik, K. H. (2007): Human GLI3 intragenic conserved non-coding sequences are tissue-specific enhancers, *PLoS ONE* (Band 2), Seite e366. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17426814](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17426814)
- [186] Loots, G. G.; Locksley, R. M.; Blankespoor, C. M.; Wang, Z. E.; Miller, W.; Rubin, E. M. und Frazer, K. A. (2000): Identification of a coordinate regulator of interleukins 4, 13, and 5 by cross-species sequence comparisons, *Science* (Band 288), Nr. 5463, Seite 136-40. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10753117](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10753117)
- [187] Sagai, T.; Hosoya, M.; Mizushima, Y.; Tamura, M. und Shiroishi, T. (2005): Elimination of a long-range cis-regulatory module causes complete loss of limb-specific Shh expression and truncation of the mouse limb, *Development* (Band 132), Nr. 4, Seite 797-803. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15677727](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15677727)
- [188] Lettice, L. A.; Heaney, S. J.; Purdie, L. A.; Li, L.; de Beer, P.; Oostra, B. A.; Goode, D.; Elgar, G.; Hill, R. E. und de Graaff, E. (2003): A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly, *Hum Mol Genet* (Band 12), Nr. 14, Seite 1725-35. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12837695](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12837695)
- [189] Velagaleti, G. V.; Bien-Willner, G. A.; Northup, J. K.; Lockhart, L. H.; Hawkins, J. C.; Jalal, S. M.; Withers, M.; Lupski, J. R. und Stankiewicz, P. (2005): Position effects due

- to chromosome breakpoints that map approximately 900 Kb upstream and approximately 1.3 Mb downstream of SOX9 in two patients with campomelic dysplasia, *Am J Hum Genet* (Band 76), Nr. 4, Seite 652-62. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15726498](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15726498)
- [190] Kouzarides, T. (2007): Chromatin modifications and their function, *Cell* (Band 128), Nr. 4, Seite 693-705. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17320507](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17320507)
- [191] Nusinzon, I. und Horvath, C. M. (2005): Histone deacetylases as transcriptional activators? Role reversal in inducible gene regulation, *Sci STKE* (Band 2005), Nr. 296, Seite re11. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16091625](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16091625)
- [192] Strahl, B. D. und Allis, C. D. (2000): The language of covalent histone modifications, *Nature* (Band 403), Nr. 6765, Seite 41-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10638745](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10638745)
- [193] Kingston, R. E. und Narlikar, G. J. (1999): ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity, *Genes Dev* (Band 13), Nr. 18, Seite 2339-52. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10500090](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10500090)
- [194] Verdone, L.; Caserta, M. und Di Mauro, E. (2005): Role of histone acetylation in the control of gene expression, *Biochem Cell Biol* (Band 83), Nr. 3, Seite 344-53. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15959560](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15959560)
- [195] Yang, X. J. (2004): Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling, *Bioessays* (Band 26), Nr. 10, Seite 1076-87. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15382140](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15382140)
- [196] Ogryzko, V. V.; Schiltz, R. L.; Russanova, V.; Howard, B. H. und Nakatani, Y. (1996): The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases, *Cell* (Band 87), Nr. 5, Seite 953-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8945521](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8945521)

- [197] Heintzman, N. D.; Stuart, R. K.; Hon, G.; Fu, Y.; Ching, C. W.; Hawkins, R. D.; Barrera, L. O.; Van Calcar, S.; Qu, C.; Ching, K. A.; Wang, W.; Weng, Z.; Green, R. D.; Crawford, G. E. und Ren, B. (2007): Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome, *Nat Genet* (Band 39), Nr. 3, Seite 311-8. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17277777](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17277777)
- [198] Pokholok, D. K.; Harbison, C. T.; Levine, S.; Cole, M.; Hannett, N. M.; Lee, T. I.; Bell, G. W.; Walker, K.; Rolfe, P. A.; Herbolzheimer, E.; Zeitlinger, J.; Lewitter, F.; Gifford, D. K. und Young, R. A. (2005): Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast, *Cell* (Band 122), Nr. 4, Seite 517-27. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16122420](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16122420)
- [199] Fukuda, H.; Sano, N.; Muto, S. und Horikoshi, M. (2006): Simple histone acetylation plays a complex role in the regulation of gene expression, *Brief Funct Genomic Proteomic* (Band 5), Nr. 3, Seite 190-208. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16980317](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16980317)
- [200] Bernstein, B. E.; Kamal, M.; Lindblad-Toh, K.; Bekiranov, S.; Bailey, D. K.; Huebert, D. J.; McMahon, S.; Karlsson, E. K.; Kulbokas, E. J., 3rd; Gingeras, T. R.; Schreiber, S. L. und Lander, E. S. (2005): Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse, *Cell* (Band 120), Nr. 2, Seite 169-81. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15680324](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15680324)
- [201] Roh, T. Y.; Wei, G.; Farrell, C. M. und Zhao, K. (2007): Genome-wide prediction of conserved and nonconserved enhancers by histone acetylation patterns, *Genome Res* (Band 17), Nr. 1, Seite 74-81. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17135569](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17135569)
- [202] Fuks, F. (2005): DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes, *Curr Opin Genet Dev* (Band 15), Nr. 5, Seite 490-5. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16098738](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16098738)
- [203] Turner, B. M. (2002): Cellular memory and the histone code, *Cell* (Band 111), Nr. 3, Seite 285-91. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12419240](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12419240)
- [204] Ng, H. H.; Xu, R. M.; Zhang, Y. und Struhl, K. (2002): Ubiquitination of histone H2B by Rad6 is required for efficient Dot1-mediated methylation of histone H3 lysine 79, J Biol Chem (Band 277), Nr. 38, Seite 34655-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12167634](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12167634)
- [205] Sun, Z. W. und Allis, C. D. (2002): Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast, Nature (Band 418), Nr. 6893, Seite 104-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12077605](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12077605)
- [206] Roh, T. Y.; Cuddapah, S.; Cui, K. und Zhao, K. (2006): The genomic landscape of histone modifications in human T cells, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 103), Nr. 43, Seite 15782-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17043231](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17043231)
- [207] Loots, G. G. und Ovcharenko, I. (2004): rVISTA 2.0: evolutionary analysis of transcription factor binding sites, Nucleic Acids Res (Band 32), Nr. Web Server issue, Seite W217-21. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15215384](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15215384)
- [208] Finger, F.; Schorle, C.; Zien, A.; Gebhard, P.; Goldring, M. B. und Aigner, T. (2003): Molecular phenotyping of human chondrocyte cell lines T/C-28a2, T/C-28a4, and C-28/I2, Arthritis Rheum (Band 48), Nr. 12, Seite 3395-403. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14673991](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14673991)
- [209] Chen, F. G.; Zhang, W. J.; Bi, D.; Liu, W.; Wei, X.; Chen, F. F.; Zhu, L.; Cui, L. und Cao, Y. (2007): Clonal analysis of nestin(-) vimentin(+) multipotent fibroblasts isolated from human dermis, J Cell Sci (Band 120), Nr. Pt 16, Seite 2875-83. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17652163](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17652163)
- [210] Junqueira, L.C. und Carneiro, J. (1996): Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen unter Berücksichtigung der Histophysiologie (Band 4. Auflage), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Budapest,

- Hongkong, London, Mailand, Paris, Santa Clara, Singapur, Tokio, ISBN: 3-540-60404-9.
- [211] Lunstrum, G. P.; Keene, D. R.; Weksler, N. B.; Cho, Y. J.; Cornwall, M. und Horton, W. A. (1999): Chondrocyte differentiation in a rat mesenchymal cell line, *J Histochem Cytochem* (Band 47), Nr. 1, Seite 1-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9857207](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9857207)
- [212] Li, Z.; Van Calcar, S.; Qu, C.; Cavenee, W. K.; Zhang, M. Q. und Ren, B. (2003): A global transcriptional regulatory role for c-Myc in Burkitt's lymphoma cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 100), Nr. 14, Seite 8164-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12808131](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12808131)
- [213] Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M. und Danielsen, M. (1987): Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 84), Nr. 21, Seite 7413-7. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2823261](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2823261)
- [214] Hampf, M. und Gossen, M. (2006): A protocol for combined Photinus and Renilla luciferase quantification compatible with protein assays, *Anal Biochem* (Band 356), Nr. 1, Seite 94-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16750160](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16750160)
- [215] Chenna, Ramu (2000): cgi-model: CGI Programming Made Easy with Python., *LINUX Journal*, Seite 142-149.
- [216] Jurka, J. (2000): Repbase update: a database and an electronic journal of repetitive elements, *Trends Genet* (Band 16), Nr. 9, Seite 418-20. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10973072](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10973072)
- [217] Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W. und Lipman, D. J. (1990): Basic local alignment search tool, *J Mol Biol* (Band 215), Nr. 3, Seite 403-10. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2231712](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2231712)
- [218] **Mangalam, Harry (1994-2001): Restriction Mapping using tacg V3, 2005-2007, <http://biotools.umassmed.edu/tacg/>**

- [219] Ovcharenko, I.; Loots, G. G.; Hardison, R. C.; Miller, W. und Stubbs, L. (2004): zPicture: dynamic alignment and visualization tool for analyzing conservation profiles, *Genome Res* (Band 14), Nr. 3, Seite 472-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=14993211](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=14993211)
- [220] King, D. C.; Taylor, J.; Elnitski, L.; Chiaromonte, F.; Miller, W. und Hardison, R. C. (2005): Evaluation of regulatory potential and conservation scores for detecting cis-regulatory modules in aligned mammalian genome sequences, *Genome Res* (Band 15), Nr. 8, Seite 1051-60. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=16024817](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16024817)
- [221] Kolbe, D.; Taylor, J.; Elnitski, L.; Eswara, P.; Li, J.; Miller, W.; Hardison, R. und Chiaromonte, F. (2004): Regulatory potential scores from genome-wide three-way alignments of human, mouse, and rat, *Genome Res* (Band 14), Nr. 4, Seite 700-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=15060013](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15060013)
- [222] Siepel, A.; Bejerano, G.; Pedersen, J. S.; Hinrichs, A. S.; Hou, M.; Rosenbloom, K.; Clawson, H.; Spieth, J.; Hillier, L. W.; Richards, S.; Weinstock, G. M.; Wilson, R. K.; Gibbs, R. A.; Kent, W. J.; Miller, W. und Haussler, D. (2005): Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes, *Genome Res* (Band 15), Nr. 8, Seite 1034-50. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=16024819](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16024819)
- [223] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis (1989): *Molecular Cloning* (Band Second Edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN: 0-87969-309-6.
- [224] Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G. und Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* (Band 51 Pt 1), Seite 263-73. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=3472723](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=3472723)
- [225] **Majlingovà P., Paroncini P., Svegliati S., Luchetti M., and Gabrielli A. (2003): Successful PCR amplification and subcloning of a GC-rich DNA fragment, *News, Qiagen. Laboratorio di Medicina Molecolare, Istituto di Clinica Medica, Polo Didattico Scientifico, Ancona, Italy, 18-19,***



[http://www1.qiagen.com/literature/qiagennews/0103/1023229\\_QNews12003\\_p18\\_19.pdf](http://www1.qiagen.com/literature/qiagennews/0103/1023229_QNews12003_p18_19.pdf)

- [226] Henke, W.; Herdel, K.; Jung, K.; Schnorr, D. und Loening, S. A. (1997): Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences, *Nucleic Acids Res* (Band 25), Nr. 19, Seite 3957-8. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9380524](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9380524)
- [227] Sanger, F.; Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 74), Nr. 12, Seite 5463-7. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=271968](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=271968)
- [228] Lottspeich F., Zorbas H. (1998): *Bioanalytik, Bibliothek, Die Deutsche, Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, ISBN: 3-8274-0041-4.*
- [229] Serra, S. und Morgante, L. (1980): [Method of determination of proteins with Coomassie brilliant blue G 250. II. Influence of pH and inorganic ions], *Boll Soc Ital Biol Sper* (Band 56), Nr. 2, Seite 166-70. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6159907](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6159907)
- [230] Bähring, S.; Nagai, T.; Toka, H. R.; Nitz, I.; Toka, O.; Aydin, A.; Muhl, A.; Wienker, T. F.; Schuster, H. und Luft, F. C. (1997): Deletion at 12p in a Japanese child with brachydactyly overlaps the assigned locus of brachydactyly with hypertension in a Turkish family, *Am J Hum Genet* (Band 60), Nr. 3, Seite 732-5. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9042935](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9042935)
- [231] Schuster, H.; Toka, O.; Toka, H. R.; Busjahn, A.; Oztekin, O.; Wienker, T. F.; Bilginturan, N.; Bähring, S.; Skrabal, F.; Haller, H. und Luft, F. C. (1998): A cross-over medication trial for patients with autosomal-dominant hypertension with brachydactyly, *Kidney Int* (Band 53), Nr. 1, Seite 167-72. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9453014](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9453014)
- [232] Schuster, H.; Wienker, T. F.; Toka, H. R.; Bähring, S.; Jeschke, E.; Toka, O.; Busjahn, A.; Hempel, A.; Tahlhammer, C.; Oelkers, W.; Kunze, J.; Bilginturan, N.; Haller, H. und Luft, F. C. (1996): Autosomal dominant hypertension and brachydactyly in a Turkish kindred resembles essential hypertension, *Hypertension* (Band 28), Nr. 6, Seite 1085-92. URL:



- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8952601](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8952601)
- [233] Perez-Torrado, R.; Yamada, D. und Defossez, P. A. (2006): Born to bind: the BTB protein-protein interaction domain, *Bioessays* (Band 28), Nr. 12, Seite 1194-202.  
URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17120193](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17120193)
- [234] Qu, S.; Tucker, S. C.; Zhao, Q.; deCrombrughe, B. und Wisdom, R. (1999): Physical and genetic interactions between Alx4 and Cart1, *Development* (Band 126), Nr. 2, Seite 359-69. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9847249](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9847249)
- [235] Karreth, F.; Hoebertz, A.; Scheuch, H.; Eferl, R. und Wagner, E. F. (2004): The AP1 transcription factor Fra2 is required for efficient cartilage development, *Development* (Band 131), Nr. 22, Seite 5717-25. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15509771](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15509771)
- [236] Mau, E.; Whetstone, H.; Yu, C.; Hopyan, S.; Wunder, J. S. und Alman, B. A. (2007): PTHrP regulates growth plate chondrocyte differentiation and proliferation in a Gli3 dependent manner utilizing hedgehog ligand dependent and independent mechanisms, *Dev Biol* (Band 305), Nr. 1, Seite 28-39. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17328886](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17328886)
- [237] Provot, S.; Kempf, H.; Murtaugh, L. C.; Chung, U. I.; Kim, D. W.; Chyung, J.; Kronenberg, H. M. und Lassar, A. B. (2006): Nkx3.2/Bapx1 acts as a negative regulator of chondrocyte maturation, *Development* (Band 133), Nr. 4, Seite 651-62.  
URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16421188](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16421188)
- [238] Goldring, M. B.; Tsuchimochi, K. und Ijiri, K. (2006): The control of chondrogenesis, *J Cell Biochem* (Band 97), Nr. 1, Seite 33-44. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16215986](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16215986)
- [239] Panman, L.; Drenth, T.; Tewelscher, P.; Zuniga, A. und Zeller, R. (2005): Genetic interaction of Gli3 and Alx4 during limb development, *Int J Dev Biol* (Band 49), Nr. 4, Seite 443-8. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15968591](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15968591)
- [240] Yan, L.; Figueroa, D. J.; Austin, C. P.; Liu, Y.; Bugianesi, R. M.; Slaughter, R. S.; Kaczorowski, G. J. und Kohler, M. G. (2004): Expression of voltage-gated potassium channels in human and rhesus pancreatic islets, *Diabetes* (Band 53), Nr. 3, Seite 597-607. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14988243](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14988243)
- [241] Schmalz, F.; Kinsella, J.; Koh, S. D.; Vogalis, F.; Schneider, A.; Flynn, E. R.; Kenyon, J. L. und Horowitz, B. (1998): Molecular identification of a component of delayed rectifier current in gastrointestinal smooth muscles, *Am J Physiol* (Band 274), Nr. 5 Pt 1, Seite G901-11. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9612272](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9612272)
- [242] Yuan, X. J.; Wang, J.; Juhaszova, M.; Golovina, V. A. und Rubin, L. J. (1998): Molecular basis and function of voltage-gated K<sup>+</sup> channels in pulmonary arterial smooth muscle cells, *Am J Physiol* (Band 274), Nr. 4 Pt 1, Seite L621-35. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9575881](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9575881)
- [243] Shukunami, C.; Ishizeki, K.; Atsumi, T.; Ohta, Y.; Suzuki, F. und Hiraki, Y. (1997): Cellular hypertrophy and calcification of embryonal carcinoma-derived chondrogenic cell line ATDC5 in vitro, *J Bone Miner Res* (Band 12), Nr. 8, Seite 1174-88. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9258747](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9258747)
- [244] Shukunami, C.; Ohta, Y.; Sakuda, M. und Hiraki, Y. (1998): Sequential progression of the differentiation program by bone morphogenetic protein-2 in chondrogenic cell line ATDC5, *Exp Cell Res* (Band 241), Nr. 1, Seite 1-11. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9633508](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9633508)
- [245] Guerrini, L.; Casalino, L.; Corti, A. und Blasi, F. (1996): NF-kappa B-mediated regulation of urokinase gene expression by PMA and TNF-alpha in human A549 cells, *FEBS Lett* (Band 393), Nr. 1, Seite 69-73. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8804426](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8804426)
- [246] Thomas, R. S.; Tymms, M. J.; McKinlay, L. H.; Shannon, M. F.; Seth, A. und Kola, I. (1997): ETS1, NFkappaB and AP1 synergistically transactivate the human GM-CSF

- promoter, *Oncogene* (Band 14), Nr. 23, Seite 2845-55. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9190901](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9190901)
- [247] Thomas, R. S.; Tymms, M. J.; Seth, A.; Shannon, M. F. und Kola, I. (1995): ETS1 transactivates the human GM-CSF promoter in Jurkat T cells stimulated with PMA and ionomycin, *Oncogene* (Band 11), Nr. 10, Seite 2135-43. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7478534](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7478534)
- [248] Li, Y.; Mak, G. und Franza, B. R., Jr. (1994): In vitro study of functional involvement of Sp1, NF-kappa B/Rel, and AP1 in phorbol 12-myristate 13-acetate-mediated HIV-1 long terminal repeat activation, *J Biol Chem* (Band 269), Nr. 48, Seite 30616-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7982981](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7982981)
- [249] Castagna, M.; Takai, Y.; Kaibuchi, K.; Sano, K.; Kikkawa, U. und Nishizuka, Y. (1982): Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters, *J Biol Chem* (Band 257), Nr. 13, Seite 7847-51. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7085651](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7085651)
- [250] Wasylyk, B.; Wasylyk, C.; Flores, P.; Begue, A.; Leprince, D. und Stehelin, D. (1990): The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation, *Nature* (Band 346), Nr. 6280, Seite 191-3. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2114554](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2114554)
- [251] Basuyaux, J. P.; Ferreira, E.; Stehelin, D. und Buttice, G. (1997): The Ets transcription factors interact with each other and with the c-Fos/c-Jun complex via distinct protein domains in a DNA-dependent and -independent manner, *J Biol Chem* (Band 272), Nr. 42, Seite 26188-95. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9334186](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9334186)
- [252] Majerus, M. A.; Bibollet-Ruche, F.; Telliez, J. B.; Wasylyk, B. und Bailleul, B. (1992): Serum, AP-1 and Ets-1 stimulate the human ets-1 promoter, *Nucleic Acids Res* (Band 20), Nr. 11, Seite 2699-703. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1614856](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1614856)

- [253] Coffey, P.; de Jonge, M.; Mettouchi, A.; Binetruy, B.; Ghysdael, J. und Kruijer, W. (1994): junB promoter regulation: Ras mediated transactivation by c-Ets-1 and c-Ets-2, *Oncogene* (Band 9), Nr. 3, Seite 911-21. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8108135](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8108135)
- [254] Angel, P.; Hattori, K.; Smeal, T. und Karin, M. (1988): The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1, *Cell* (Band 55), Nr. 5, Seite 875-85. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3142689](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3142689)
- [255] Oka, T.; Rairkar, A. und Chen, J. H. (1991): Structural and functional analysis of the regulatory sequences of the ets-1 gene, *Oncogene* (Band 6), Nr. 11, Seite 2077-83. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1945412](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1945412)
- [256] Hashimoto, J.; Kariya, Y. und Miyazaki, K. (2006): Regulation of proliferation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by laminin-5 (laminin-332), *Stem Cells* (Band 24), Nr. 11, Seite 2346-54. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17071854](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17071854)
- [257] Scharstuhl, A.; Schewe, B.; Benz, K.; Gaissmaier, C.; Buhning, H. J. und Stoop, R. (2007): Chondrogenic potential of human adult mesenchymal stem cells is independent of age or osteoarthritis etiology, *Stem Cells* (Band 25), Nr. 12, Seite 3244-51. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17872501](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17872501)
- [258] Lanske, B.; Karaplis, A. C.; Lee, K.; Luz, A.; Vortkamp, A.; Pirro, A.; Karperien, M.; Defize, L. H.; Ho, C.; Mulligan, R. C.; Abou-Samra, A. B.; Juppner, H.; Segre, G. V. und Kronenberg, H. M. (1996): PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth, *Science* (Band 273), Nr. 5275, Seite 663-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8662561](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8662561)
- [259] Chen, X.; Macica, C. M.; Dreyer, B. E.; Hammond, V. E.; Hens, J. R.; Philbrick, W. M. und Broadus, A. E. (2006): Initial characterization of PTH-related protein gene-driven lacZ expression in the mouse, *J Bone Miner Res* (Band 21), Nr. 1, Seite 113-23. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16355280](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16355280)
- [260] Gao, B.; Hu, J.; Stricker, S.; Cheung, M.; Ma, G.; Law, K. F.; Witte, F.; Briscoe, J.; Mundlos, S.; He, L.; Cheah, K. S. und Chan, D. (2009): A mutation in Ihh that causes digit abnormalities alters its signalling capacity and range, *Nature*. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19252479](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19252479)
- [261] Wohlrab, D.; Wohlrab, J.; Reichel, H. und Hein, W. (2001): Is the proliferation of human chondrocytes regulated by ionic channels? *J Orthop Sci* (Band 6), Nr. 2, Seite 155-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11484102](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11484102)
- [262] Grandolfo, M.; Martina, M.; Ruzzier, F. und Vittur, F. (1990): A potassium channel in cultured chondrocytes, *Calcif Tissue Int* (Band 47), Nr. 5, Seite 302-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2257524](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2257524)
- [263] Stogios, P. J.; Downs, G. S.; Jauhal, J. J.; Nandra, S. K. und Prive, G. G. (2005): Sequence and structural analysis of BTB domain proteins, *Genome Biol* (Band 6), Nr. 10, Seite R82. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16207353](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16207353)
- [264] Mardones, G. A.; Burgos, P. V.; Brooks, D. A.; Parkinson-Lawrence, E.; Mattera, R. und Bonifacino, J. S. (2007): The trans-Golgi network accessory protein p56 promotes long-range movement of GGA/clathrin-containing transport carriers and lysosomal enzyme sorting, *Mol Biol Cell* (Band 18), Nr. 9, Seite 3486-501. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17596511](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17596511)
- [265] Hennies, H. C.; Kornak, U.; Zhang, H.; Egerer, J.; Zhang, X.; Seifert, W.; Kuhnisch, J.; Budde, B.; Natebus, M.; Brancati, F.; Wilcox, W. R.; Muller, D.; Kaplan, P. B.; Rajab, A.; Zampino, G.; Fodale, V.; Dallapiccola, B.; Newman, W.; Metcalfe, K.; Clayton-Smith, J.; Tassabehji, M.; Steinmann, B.; Barr, F. A.; Nurnberg, P.; Wieacker, P. und Mundlos, S. (2008): Geroderma osteodysplastica is caused by mutations in SCYL1BP1, a Rab-6 interacting golgin, *Nat Genet* (Band 40), Nr. 12, Seite 1410-2. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18997784](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18997784)

- [266] Hardison, R. C. (2000): Conserved noncoding sequences are reliable guides to regulatory elements, *Trends Genet* (Band 16), Nr. 9, Seite 369-72. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10973062](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10973062)
- [267] Hallikas, O.; Palin, K.; Sinjushina, N.; Rautiainen, R.; Partanen, J.; Ukkonen, E. und Taipale, J. (2006): Genome-wide prediction of mammalian enhancers based on analysis of transcription-factor binding affinity, *Cell* (Band 124), Nr. 1, Seite 47-59. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16413481](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16413481)
- [268] Pennacchio, L. A. und Rubin, E. M. (2001): Genomic strategies to identify mammalian regulatory sequences, *Nat Rev Genet* (Band 2), Nr. 2, Seite 100-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11253049](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11253049)
- [269] Fisher, R. J.; Mavrothalassitis, G.; Kondoh, A. und Papas, T. S. (1991): High-affinity DNA-protein interactions of the cellular ETS1 protein: the determination of the ETS binding motif, *Oncogene* (Band 6), Nr. 12, Seite 2249-54. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1766672](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1766672)
- [270] Lanske, B. und Kronenberg, H. M. (1998): Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) and parathyroid hormone (PTH)/PTHrP receptor, *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* (Band 8), Nr. 3-4, Seite 297-320. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9807698](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9807698)
- [271] Massfelder, T. und Helwig, J. J. (2003): The parathyroid hormone-related protein system: more data but more unsolved questions, *Curr Opin Nephrol Hypertens* (Band 12), Nr. 1, Seite 35-42. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12496664](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12496664)
- [272] Esbrit, P.; Santos, S.; Ortega, A.; Fernandez-Agullo, T.; Velez, E.; Troya, S.; Garrido, P.; Pena, A.; Bover, J. und Bosch, R. J. (2001): Parathyroid hormone-related protein as a renal regulating factor. From vessels to glomeruli and tubular epithelium, *Am J Nephrol* (Band 21), Nr. 3, Seite 179-84. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11423685](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11423685)

- [273] Lam, M. H.; Thomas, R. J.; Martin, T. J.; Gillespie, M. T. und Jans, D. A. (2000): Nuclear and nucleolar localization of parathyroid hormone-related protein, *Immunol Cell Biol* (Band 78), Nr. 4, Seite 395-402. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10947864](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10947864)
- [274] Kronenberg, H. M. (2006): PTHrP and skeletal development, *Ann N Y Acad Sci* (Band 1068), Seite 1-13. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16831900](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16831900)
- [275] Halapas, A.; Tenta, R.; Pantos, C.; Cokkinos, D. V. und Koutsilieris, M. (2003): Parathyroid hormone-related peptide and cardiovascular system, *In Vivo* (Band 17), Nr. 5, Seite 425-32. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14598605](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14598605)
- [276] Goltzman, D. und White, J. H. (2000): Developmental and tissue-specific regulation of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor gene expression, *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* (Band 10), Nr. 2, Seite 135-49. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11186329](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11186329)
- [277] Atsumi, T.; Miwa, Y.; Kimata, K. und Ikawa, Y. (1990): A chondrogenic cell line derived from a differentiating culture of AT805 teratocarcinoma cells, *Cell Differ Dev* (Band 30), Nr. 2, Seite 109-16. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2201423](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2201423)
- [278] Shukunami, C.; Shigeno, C.; Atsumi, T.; Ishizeki, K.; Suzuki, F. und Hiraki, Y. (1996): Chondrogenic differentiation of clonal mouse embryonic cell line ATDC5 in vitro: differentiation-dependent gene expression of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor, *J Cell Biol* (Band 133), Nr. 2, Seite 457-68. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8609176](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8609176)
- [279] Shinomura, T.; Ito, K.; Kimura, J. H. und Hook, M. (2006): Screening for genes preferentially expressed in the early phase of chondrogenesis, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 341), Nr. 1, Seite 167-74. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16412979](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16412979)



- [280] Chen, L.; Fink, T.; Zhang, X. Y.; Ebbesen, P. und Zachar, V. (2005): Quantitative transcriptional profiling of ATDC5 mouse progenitor cells during chondrogenesis, *Differentiation* (Band 73), Nr. 7, Seite 350-63. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16219039](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16219039)
- [281] Barski, A.; Cuddapah, S.; Cui, K.; Roh, T. Y.; Schones, D. E.; Wang, Z.; Wei, G.; Chepelev, I. und Zhao, K. (2007): High-resolution profiling of histone methylations in the human genome, *Cell* (Band 129), Nr. 4, Seite 823-37. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17512414](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17512414)
- [282] Bernstein, B. E.; Mikkelsen, T. S.; Xie, X.; Kamal, M.; Huebert, D. J.; Cuff, J.; Fry, B.; Meissner, A.; Wernig, M.; Plath, K.; Jaenisch, R.; Wagschal, A.; Feil, R.; Schreiber, S. L. und Lander, E. S. (2006): A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells, *Cell* (Band 125), Nr. 2, Seite 315-26. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16630819](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16630819)
- [283] Stuardo, M.; Martinez, M.; Hidalgo, K.; Montecino, M.; Javed, A.; Lian, J. B.; Stein, G. S.; Stein, J. L. und Gutierrez, S. E. (2009): Altered chromatin modifications in AML1/RUNX1 breakpoint regions involved in (8;21) translocation, *J Cell Physiol* (Band 218), Nr. 2, Seite 343-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18853425](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18853425)
- [284] Pei, H.; Yordy, J. S.; Leng, Q.; Zhao, Q.; Watson, D. K. und Li, R. (2003): EAPII interacts with ETS1 and modulates its transcriptional function, *Oncogene* (Band 22), Nr. 18, Seite 2699-709. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12743594](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12743594)
- [285] Logan, S. K.; Garabedian, M. J.; Campbell, C. E. und Werb, Z. (1996): Synergistic transcriptional activation of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promoter via functional interaction of AP-1 and Ets-1 transcription factors, *J Biol Chem* (Band 271), Nr. 2, Seite 774-82. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8557686](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8557686)
- [286] Cirillo, G.; Casalino, L.; Vallone, D.; Caracciolo, A.; De Cesare, D. und Verde, P. (1999): Role of distinct mitogen-activated protein kinase pathways and cooperation between Ets-2, ATF-2, and Jun family members in human urokinase-type



- plasminogen activator gene induction by interleukin-1 and tetradecanoyl phorbol acetate, *Mol Cell Biol* (Band 19), Nr. 9, Seite 6240-52. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10454570](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10454570)
- [287] Zhang, M.; Maass, N.; Magit, D. und Sager, R. (1997): Transactivation through Ets and Ap1 transcription sites determines the expression of the tumor-suppressing gene maspin, *Cell Growth Differ* (Band 8), Nr. 2, Seite 179-86. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9040939](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9040939)
- [288] Richard, V.; Nadella, M. V.; Green, P. L.; Lairmore, M. D.; Feuer, G.; Foley, J. G. und Rosol, T. J. (2005): Transcriptional regulation of parathyroid hormone-related protein promoter P3 by ETS-1 in adult T-cell leukemia/lymphoma, *Leukemia* (Band 19), Nr. 7, Seite 1175-83. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15889157](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15889157)
- [289] Asadi, F. und Kukreja, S. (2005): Parathyroid hormone-related protein in prostate cancer, *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* (Band 15), Nr. 1, Seite 15-28. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15831076](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15831076)
- [290] Hamzaoui, H.; Rizk-Rabin, M.; Gordon, J.; Offutt, C.; Bertherat, J. und Bouizar, Z. (2007): PTHrP P3 promoter activity in breast cancer cell lines: role of Ets1 and CBP (CREB binding protein), *Mol Cell Endocrinol* (Band 268), Nr. 1-2, Seite 75-84. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17321669](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17321669)
- [291] Dittmer, J.; Geggion, A.; Gitlin, S. D.; Ghysdael, J. und Brady, J. N. (1994): Regulation of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) gene expression. Sp1 binds through an inverted CACCC motif and regulates promoter activity in cooperation with Ets1, *J Biol Chem* (Band 269), Nr. 34, Seite 21428-34. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8063775](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8063775)
- [292] Lindemann, R. K.; Braig, M.; Hauser, C. A.; Nordheim, A. und Dittmer, J. (2003): Ets2 and protein kinase C epsilon are important regulators of parathyroid hormone-related protein expression in MCF-7 breast cancer cells, *Biochem J* (Band 372), Nr. Pt 3, Seite 787-97. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12628005](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12628005)

- [293] Dittmer, J.; Gitlin, S. D.; Reid, R. L. und Brady, J. N. (1993): Transactivation of the P2 promoter of parathyroid hormone-related protein by human T-cell lymphotropic virus type I Tax1: evidence for the involvement of transcription factor Ets1, J Virol (Band 67), Nr. 10, Seite 6087-95. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8371355](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8371355)
- [294] Dittmer, J.; Pise-Masison, C. A.; Clemens, K. E.; Choi, K. S. und Brady, J. N. (1997): Interaction of human T-cell lymphotropic virus type I Tax, Ets1, and Sp1 in transactivation of the PTHrP P2 promoter, J Biol Chem (Band 272), Nr. 8, Seite 4953-8. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9030555](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9030555)
- [295] Cataisson, C.; Gordon, J.; Roussiere, M.; Abdalkhani, A.; Lindemann, R.; Dittmer, J.; Foley, J. und Bouizar, Z. (2003): Ets-1 activates parathyroid hormone-related protein gene expression in tumorigenic breast epithelial cells, Mol Cell Endocrinol (Band 204), Nr. 1-2, Seite 155-68. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12850290](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12850290)
- [296] Ejima, E.; Rosenblatt, J. D.; Massari, M.; Quan, E.; Stephens, D.; Rosen, C. A. und Prager, D. (1993): Cell-type-specific transactivation of the parathyroid hormone-related protein gene promoter by the human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) tax and HTLV-II tax proteins, Blood (Band 81), Nr. 4, Seite 1017-24. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8427983](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8427983)
- [297] Kameda, T.; Watanabe, H. und Iba, H. (1997): C-Jun and JunD suppress maturation of chondrocytes, Cell Growth Differ (Band 8), Nr. 5, Seite 495-503. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9149901](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9149901)
- [298] Bakiri, L.; Takada, Y.; Radolf, M.; Eferl, R.; Yaniv, M.; Wagner, E. F. und Matsuo, K. (2007): Role of heterodimerization of c-Fos and Fra1 proteins in osteoclast differentiation, Bone (Band 40), Nr. 4, Seite 867-75. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17189721](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17189721)
- [299] Seghatoleslami, M. R. und Tuan, R. S. (2002): Cell density dependent regulation of AP-1 activity is important for chondrogenic differentiation of C3H10T1/2 mesenchymal cells, J Cell Biochem (Band 84), Nr. 2, Seite 237-48. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11787053](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11787053)
- [300] Yates, K. E. (2006): Identification of cis and trans-acting transcriptional regulators in chondroinduced fibroblasts from the pre-phenotypic gene expression profile, *Gene* (Band 377), Seite 77-87. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16644146](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16644146)
- [301] Kronenberg, H. M. (2003): Developmental regulation of the growth plate, *Nature* (Band 423), Nr. 6937, Seite 332-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12748651](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12748651)
- [302] Kobayashi, T.; Soegiarto, D. W.; Yang, Y.; Lanske, B.; Schipani, E.; McMahon, A. P. und Kronenberg, H. M. (2005): Indian hedgehog stimulates periarticular chondrocyte differentiation to regulate growth plate length independently of PTHrP, *J Clin Invest* (Band 115), Nr. 7, Seite 1734-42. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15951842](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15951842)
- [303] Ionescu, A. M.; Schwarz, E. M.; Vinson, C.; Puzas, J. E.; Rosier, R.; Reynolds, P. R. und O'Keefe, R. J. (2001): PTHrP modulates chondrocyte differentiation through AP-1 and CREB signaling, *J Biol Chem* (Band 276), Nr. 15, Seite 11639-47. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11136722](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11136722)
- [304] Riemer, S.; Gebhard, S.; Beier, F.; Poschl, E. und von der Mark, K. (2002): Role of c-fos in the regulation of type X collagen gene expression by PTH and PTHrP: localization of a PTH/PTHrP-responsive region in the human COL10A1 enhancer, *J Cell Biochem* (Band 86), Nr. 4, Seite 688-99. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12210735](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12210735)
- [305] Thomas, D. P.; Sunters, A.; Gentry, A. und Grigoriadis, A. E. (2000): Inhibition of chondrocyte differentiation in vitro by constitutive and inducible overexpression of the c-fos proto-oncogene, *J Cell Sci* (Band 113 (Pt 3)), Seite 439-50. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10639331](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10639331)
- [306] Watanabe, H.; Saitoh, K.; Kameda, T.; Murakami, M.; Niikura, Y.; Okazaki, S.; Morishita, Y.; Mori, S.; Yokouchi, Y.; Kuroiwa, A. und Iba, H. (1997): Chondrocytes as a specific target of ectopic Fos expression in early development, *Proc Natl Acad Sci U*

- S A (Band 94), Nr. 8, Seite 3994-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9108093](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9108093)
- [307] O'Geen, H.; Nicolet, C. M.; Blahnik, K.; Green, R. und Farnham, P. J. (2006): Comparison of sample preparation methods for ChIP-chip assays, *Biotechniques* (Band 41), Nr. 5, Seite 577-80. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17140114](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17140114)
- [308] Carter, D.; Chakalova, L.; Osborne, C. S.; Dai, Y. F. und Fraser, P. (2002): Long-range chromatin regulatory interactions in vivo, *Nat Genet* (Band 32), Nr. 4, Seite 623-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12426570](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12426570)
- [309] Dekker, J. (2006): The three 'C' s of chromosome conformation capture: controls, controls, controls, *Nat Methods* (Band 3), Nr. 1, Seite 17-21. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16369547](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16369547)
- [310] Iafrate, A. J.; Feuk, L.; Rivera, M. N.; Listewnik, M. L.; Donahoe, P. K.; Qi, Y.; Scherer, S. W. und Lee, C. (2004): Detection of large-scale variation in the human genome, *Nat Genet* (Band 36), Nr. 9, Seite 949-51. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15286789](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15286789)
- [311] McCarroll, S. A.; Hadnott, T. N.; Perry, G. H.; Sabeti, P. C.; Zody, M. C.; Barrett, J. C.; Dallaire, S.; Gabriel, S. B.; Lee, C.; Daly, M. J. und Altshuler, D. M. (2006): Common deletion polymorphisms in the human genome, *Nat Genet* (Band 38), Nr. 1, Seite 86-92. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16468122](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16468122)
- [312] Sebat, J.; Lakshmi, B.; Troge, J.; Alexander, J.; Young, J.; Lundin, P.; Maner, S.; Massa, H.; Walker, M.; Chi, M.; Navin, N.; Lucito, R.; Healy, J.; Hicks, J.; Ye, K.; Reiner, A.; Gilliam, T. C.; Trask, B.; Patterson, N.; Zetterberg, A. und Wigler, M. (2004): Large-scale copy number polymorphism in the human genome, *Science* (Band 305), Nr. 5683, Seite 525-8. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15273396](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15273396)

## 9. Anhang Oligonukleotide

### 9.1 Tab. 3: Sondenprimer für *Southernblotting*

Produkt	5' Sequenz	3' Sequenz	Tm [°C]	MgCl <sub>2</sub> [mM]	cycl.	Poly.	Ext. [sec]	Amplikon [bp]
Sonde 1 Chr.8	AGACTTCACTCGCATTTTCAC	GCTCTAGGCATTGATTTATTG	60	3,5	35	Taq	90	895
Sonde 2 Chr.8	GGAGACTTTTATGGGGTGTG	AAGGGTTCGTGCTACTATGAG	62	3,5	35	Taq	90	961
Sonde 3 Chr.8	TTCTTGTGGTGATGCCCTT	GCCATATAATCAGGGAGCAGT	60	3,5	35	Taq	90	943
Sonde 4 Chr.8	CCCACTGAGACCAAGACATAGA	CAGCAAGATGAAAAACAAACCT	60	3,5	35	Taq	90	732
Sonde 5 Chr.8	AAAAGAGGGATAGAGGGAAGG	ACTGAGTTTCCTTGCTTCTGC	60	3,5	35	Taq	90	798
Sonde 6 Chr.8	TAGAGTGATTGCTGGAACCTT	GATGGGATGGATTCTAAGTGA	60	3,5	35	Taq	90	925
Sonde 7 Chr.8	GTGCCTGCTATGGAGAATGC	TAGGTAGAGGAGGGACTGACAC	60	3,5	35	Taq	90	804
Sonde 9 Chr.8	AGGATGAGGGCTTCTGTGC	CAATAAATGCCACTGACTAAATGA	64	3,5	35	Taq	90	554
Sonde 10 Chr.8	CCAAGGCAAACTGAAAGACTG	ATCACAGGAAGTAGGCAGCAAA	64	3,5	35	Taq	90	866
Sonde 1 Chr.12	GGCTTAGTCACACCACAAAAT	TAACGCACAGAACGACAGCA	62	3,5	35	Taq	90	975
Sonde 2 Chr.12	ACCACACCCAAGTAAAGATTC	GGTGGTCTGATGTCCCTTTTA	62	3,5	35	Taq	90	848
Sonde 3 Chr.12	ACTTTATGTGTTGCCTCGTCT	AGAAAAGTGTGCCTCATCCTC	62	3,5	35	Taq	90	877
Sonde 4 Chr.12	TAGTGACTTTGAGCCATTGAGTT	AGGTACAACAAAGGAAAACTGA	60	2,5	35	Taq	90	715
Sonde 5 Chr.12	ACAGGCAAAAAGTTCTAAAGGA	CCAGCCAACACCACAAAGT	62	3,5	35	Taq	90	726
Sonde 6 Chr.12	TGGTGGGGTGCTATTTCCTATT	CAAAGTCCTCATCCACCCATTA	62	3,5	35	Taq	90	857

**9.2 Tab. 4: Primer für putatives Fusionstranskript von *PTHLH* Exons mit Exon 1 und/oder 2 von *KCNB2***

Produkt	5' Sequenz	3' Sequenz	Tm [°C]	MgCl <sub>2</sub> [mM]	cycl.	Poly.	Ext. [min]	Amplikon [bp]
KCNB2_E1-E3	CTGTTCCAGCCCTCTCTTGTC	CCACACTGCCCTCTTCTCTTA	62	1,8	60	Elongase	4	3030
KCNB2_E1+PTHLH_E1	GCTCGCTTTCTGGCTCCTTC	CTGGTGGGCTGGTTGCTTC	?	?	?	Elongase	?	?
KCNB2_E1+PTHLH_E2	GCTCGCTTTCTGGCTCCTT	CGACGCTCCACTGCTGAAC	?	?	?	Elongase	?	?
KCNB2_E1+PTHLH_E3	CTGTTCCAGCCCTCTCTTGTC	TTCTTCCCAGGTGTCTTGAGC	?	?	?	Elongase	?	?
KCNB2_E1+PTHLH_E4	GCTCGCTTTCTGGCTCCTT	CTTGAAGGTCTCTGCTGAAAA	?	?	?	Elongase	?	?
KCNB2_E2+PTHLH_E1	ACACTTTCCTTCCTCCAG	GTTGGAGGCGAGTTGAAAA	?	?	?	Elongase	?	?
KCNB2_E2+PTHLH_E2	CCTCAACCACGAAGTCCTGT	ACGCTCCACTGCTGAACCA	?	?	?	Elongase	?	?
KCNB2_E2+PTHLH_E3	GACACTTTCCTTCCTCCAG	TTTCTTTTCCTGCTCCTTGC	?	?	?	Elongase	?	?
KCNB2_E2+PTHLH_E4	CCTCAACCACGAAGTCCTGT	ATTCAGCAGCACCAAGATACAT	?	?	?	Elongase	?	?
PTHLH_E1-E4	TTTTCAACTCGCCTCCAACCT	GCAATGGGGGAGACAGTTTTA	64	1,8	60	Elongase	1	893

**9.3 Tab. 5: Primer für 5' RACE an ATDC5 und C28/I2 Zellen**

Produkt	3' Sequenz
Pthlh mouse	AGGGCACGGAGTAGCTGAGCAGGAATA
Pthlh mouse nested	ACTGCTGAACCAGCCTCCGAGCAT
PTHLH human	TGGATGGACTTCCCCTTGTCATGGA
PTHLH human nested	CCCCTTGTCATGGAGGAGCTGATGTTCA

#### 9.4 Tab. 6: Primer mit Spe I und Sac I Restriktionsorten für *PTHLH* – Regulator – Reportergenkonstrukte

Produkt	Restriktionsorte (5' – 3')	5' Sequenz	3' Sequenz
der(8)	Spe I – Sac I	TGCGTGACTAGTTGAGTCACCAAGGATTGAGCTCTGCGTG	CACGCAGAGCTCAATCCTTGGTGACTCAACTAGTCACGCA
der(8)x3	Spe I – Sac I	TGCGTGACTAGTTGAGTCACCAAGGATTTGAGTCACCAAGGAT TTGAGTCACCAAGGATTGAGCTCTGCGTG	CACGCAGAGCTCAATCCTTGGTGACTCAAATCCTTGGTGACTC AAATCCTTGGTGACTCAACTAGTCACGCA
Wt-chr.12	Spe I – Sac I	TGCGTGACTAGTTGAGTCATGAAACCTCGAGCTCTGCGTG	CACGCAGAGCTCGAGGTTTCATGACTCAACTAGTCACGCA
Wt-chr.12x3	Spe I – Sac I	TGCGTGACTAGTTGAGTCATGAAACCTCTGAGTCATGAAACCT CTGAGTCATGAAACCTCGAGCTCTGCGTG	CACGCAGAGCTCGAGGTTTCATGACTCAGAGGTTTCATGACTC AGAGGTTTCATGACTCAACTAGTCACGCA
Wt-chr.8	Spe I – Sac I	TGCGTGGAGCTCGACCAACTTAGGAACCACTAGTTGCGTG	CACGCAACTAGTGGTTCCTAAGTTGGTCGAGCTCCACGCA
Wt-chr.8x3	Spe I – Sac I	TGCGTGGAGCTCGACCAACTTAGGAACCGACCAACTTAGGAAC CGACCAACTTAGGAACCACTAGTTGCGTG	CACGCAACTAGTGGTTCCTAAGTTGGTCGGTTCCTAAGTTGGT CGGTTTCCTAAGTTGGTCGAGCTCCACGCA
<i>PTHLH</i> Promotor 3080 bp (Roche Expand LongTemplate Kit)	52° C Annealing, 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 + 25 cycles, 9 min Extension, + 1,2 M Betaine	TATCCTTTCCAAACAGGCAAAAA	CACACAGCCAGAAAGAGCAAAAA

#### 9.5 Tab. 7: Primer zur Quantifizierung chondrogener Genexpression mittels QPCR

Produkt	5' Sequenz	3' Sequenz	Tm [°C]	cycl.	Amplikon [bp]
Col2A1	TGGAAAAGATGGTCCCAAAG	GGGGAATCCTCTCTACCAC	60	45	217
Col10A1	GCAGCATTACGACCCAAGAT	TCTGTGAGCTCCATGATTGC	60	45	201
Pthlh	CAGCCGAAATCAGAGCTACC	CTCCTGTTCTCTGCGTTTCC	60	45	206

Ihh	CTCACTGGCCATCTCTGTCA	TGGGCCTTGGACTCGTAATA	60	45	219
PTHLH (mouse/human)	GAGGTGTCCCCTAACTCCAA	TCTTTGTACGTCTCCACCTTGTT	60	45	122
IHH	TTCTGCCTGGTCCTGTTGC	GCAAGTGAGCGGGTGTGAG	60	45	796
COL2A1	CAACCAGGACCAAAGGGACAG	AGCCAGGAGCACCAGCAATG	60	45	500
Aggrecan	TGAGTGTCTCAGCATCCCCCAACC	GATGAGGGGTCGGGGTAGCC	60	45	940

## 9.6 Tab. 8: Primer für Positiv-, Negativkontrollen und spezifische Nachweise von Chromatin Immunopräzipitationen

Produkt (human)	Kontrolle AK (+/-)	5' Sequenz	3' Sequenz	Tm [°C]	cycl.	Amplikon [bp]
GAPDH	H3K4me1 +, H3K9me3 -, H3K9ac +	TACTAGCGGTTTTACGGGCG	TCGAACAGGAGGAGCAGAGA	60	45	166
ALDOA	H3K4me1, me3 +	TCCTGGCAAGATAAGGAGTTGAC	ACACACGATAGCCCTAGCAGTTC	60	45	121
ACTg	H3K4me1, me3 -, H3K27me3 -, H3K9ac -	CGGAAAGATCGCCATATATGGAC	ACCGGCAGAGAAACGCGA	60	45	173
SAT2	H3K9me3 +, H3K27me3 +	ATCGAATGGAAATGAAAGGAGTCA	GACCATTGGATGATTGCAGTCA	60	45	160
PTHLH TSS	/	GTTTTCAACTCGCCTCCAAC	GTTTCAAGTGCGTGTGTCGT	60	45	152
PTHLH TATA	/	ACATTGGCTATGGGAGACGTG	AACCGGCTACTCCAACGTG	60	45	168
Wt-chr.12 BP	/	TCCAGCCAAACACAATACA	GCCATGGGCAGATTACATACA	60	45	122
Wt-chr.8 BP	/	TTTTCCCAAATATTTTCATCTG	GGCTTTATTACCTCCCACAGC	60	45	102
der(8) BP	/	CCCAGCCAAACACAATACAC	TGTATTGTTATTTTCCTTGCTTTTT	60	45	116



Produkt (mouse)	Kontrolle AK (+/-)					
Rpl30	H3K4me1, me3 +	TACATGCTGGGGTATGGACA	TTCTATTTTCAGATTTCTCAAAGC	60	45	105
Actg	H3K4me1, me3 -, H3K27me3 -, H3K9ac -	CCCGGCTTTTGGAAAGAT	GGCAAGAAGCGCAGTGTAAAG	60	45	151
Sat2	H3K9me3 +	TGGGAATCATTGTAGCACGTA	CTCAGGGTTTATTCCATTCCA	60	45	152
Gapdh	H3K9me3 -, H3K9ac +	CCTCTGCGCCCTTGAGCTAGGA	CACAAGAAGATGCGGCCGTCTC	60	45	158
Myod1	H3K27me3 +	AGTGAATGAGGCCTTCGAGA	GACCTTCGATGTAGCGGATG	60	45	107
Pthlh TSS	/	GCTGGGCTCACAGCTACTCT	CTTCCGGAAAGTTGATTCCA	60	45	154
Pthlh TATA	/	ACATTGCTATGGGAGCCACA	GGAATCAGCGCCTCTAACTG	60	45	166
Wt-chr.12 BP	/	TGGACAAAGACCACATGTTTG	CACAGGCATGGATCACACC	60	45	150

## 9.7 Tab. 9: Oligonukleotide für EMSA

Produkt	5' Sequenz	3' Sequenz	Amplikon [bp]
AP1 control oligo *	CGCTTGAT <b>TGAGTC</b> AGCCGGAA	TTCCGGCTGACTCATCAAGCG	21
Ets-1 control oligo *	GATCTCGAGCC <b>GGAA</b> GTTCTGA	TCGAACTTCCGGCTCGAGATC	21
der(8)	GACACAG <b>TGAGTC</b> ACCA <b>GGAT</b> TCAACC	GGTTGAATCCTTGGTGACTCACTGTGTC	28
wt(12)	GACACAG <b>TGAGTC</b> ATGAAACCTCG	CGAGGTTTCATGACTCACTGTGTC	24
wt(8)	CGACCAACTTA <b>GGAA</b> CCA	TGGTTCCTAAGTTGGTCG	18

\* - PIERCE Labs, [269, 284]

## 10. Abbildungsverzeichnis

		Seite
Abb. 1	Initiale Organisationsstruktur und Differenzierung der Gliedmassenanlage in der Embryonalentwicklung	14
Abb. 2	Hauptregulatoren mesenchymaler Zellkondensationen	15
Abb. 3	Schematischer Knorpel- / Knochenaufbau	18
Abb. 4	Hauptregulatoren der enchondralen Ossifikation und ihre gewebespezifische Expression (IHH / PTHrP Signale)	21
Abb. 5	Aufbau der oberen Vertebraten Extremität und essentielle chondrogene Regulatoren der Fingerbildung	22
Abb. 6	Chromosomenaberrationen	26
Abb. 7	Asymmetrisches und symmetrisches Bindungsmotiv der Topoisomerase II	27
Abb. 8	Erkennungssequenzen von Translin	27
Abb. 9	Genetische Modifikationen, die die Genregulation beeinflussen	30
Abb. 10	Räumliche Modelle (I-IV) zur cis-Regulation von Genen	31
Abb. 11	Stammbaum der Familie mit t(8;12)	35
Abb. 12	pCR®2-TOPO Vektor	57
Abb. 13	Luziferasevektor pGL2 basic und Luziferasevektor pRL-TK	68
Abb. 14	Metaphase-FISH zur Eingrenzung der Bruchpunktregionen	76
Abb. 15	Restriktionskarten für PFGE- oder MAXI-Gel basiertes <i>Southernblotting</i>	78-79
Abb. 16	<i>Southernblotting</i> Experimente auf der(8)	80
Abb. 17	<i>Southernblotting</i> Experimente auf der(12)	81
Abb. 18	Sequenzanalyse des Bruchpunktes auf der(8) und der(12)	82
Abb. 19	Genomische Umgebung der Bruchpunkte auf der(8) und der(12)	83
Abb. 20	<i>In silico</i> Sequenzanalyse der Bruchpunkte auf der(8) und der(12) bezüglich Bindungsmotiven für die Topoisomerase II und Translin	84
Abb. 21	<i>In silico</i> Analyse der Sequenzkonservierung an Bruchpunkten von t(8;12)	85
Abb. 22	<i>In situ</i> Hybridisierung von <i>Kcnb2</i> an transversalen murinen Embryonalschnitten der Stadien 12,5 und 14,5	87
Abb. 23	<i>Kcnb2 in situ</i> Hybridisierung an murinen Schnitten oberer Extremitäten der Stadien 13,5 und 14,5 und <i>Whole Mount in situ</i>	88

	Hybridisierung an Stadium 12,5	
Abb. 24	<i>Nodule formation</i> , Alzianblau-Färbung und Expressionsanalyse knorpelspezifischer Marker von ITS-differenzierten ATDC5 Zellen (0 – 21 Tage)	91
Abb. 25	5' RACE von <i>PTH LH</i> Transkripten in ATDC5 und C28/I2 Zellen zur <i>PTH LH</i> Promotor Identifikation	92
Abb. 26	Chromatin Immunopräzipitationen (ChIP) an ATDC5, ATDC 9d, C28/I2 und Patientenfibroblasten mit Antikörpern gegen H3K4me1, H3K4me3, H3K9me3 und H3K27me3 Histonmodifikationen	95
Abb. 27	Reporterassays zur Evaluierung der cis-aktiven Bruchpunktsequenz	96
Abb. 28	<i>Electromobility Shift Assays</i> (EMSA) mit humanem rekombinanten AP1 (c-jun) und C-ets-1	97
Abb. 29	PMA Stimulation von ATDC5 und C28/I2 Zellen zur c-jun, C-ets-1 und PTHrP Detektion auf Proteinebene	98
Abb. 30	PMA-unabhängige PTHrP-Aktivierung durch Überexpression von transfizierten <i>JUN</i> , <i>JUNB</i> , <i>FOS</i> und <i>ETS1</i>	100
Abb. 31	<i>PTH LH</i> Fehlregulation in chondrogeninduzierten Fibroblasten	101-102

## 11. Danksagung

Ich möchte Herrn Professor Friedrich C. Luft und Frau Dr. Sylvia Bähring für dieses interessante und komplexe Projekt danken. Es war an hochaktueller Forschung orientiert und bedurfte die Anwendung neuester Methoden. Die professionelle, kritische und finanzielle Unterstützung, sowie Entscheidungsfreiheit und Verantwortung in diesem und anderen Projekten haben die beschriebenen Ergebnisse generiert, produktive Kooperationen ergeben und mir eine sehr gute Ausbildung ermöglicht. Der Einblick in die Wissenschaftspolitik, Drittmittelorganisation und Arbeitsgruppenkoordination erweiterte meine wissenschaftliche Tätigkeit und Kompetenz. Sylvia Bähring danke ich für die immerwährende Hilfe und die stets offene Tür für Fragen und kreativen Austausch. Herrn Dr. Atakan Aydin danke ich für methodische und technische Problemlösungen und für die Y-chromosomale Unterstützung.

Großen Dank möchte ich Frau Professor Mary B. Goldring, Frau Dr. Cecilia Dragomir, Herrn Dr. Kaneyuki Tsuchimochi und Herrn Dr. Miguel Otero aussprechen, die zu dieser Dissertation viele ergiebige Ideen und Material lieferten und dieses erfolgreiche Projekt unterstützten. Mein New York Aufenthalt wird sicherlich nicht der Letzte gewesen sein.

Astrid Mühl, Eireen Klein, Irene Holfinger, Yvette Neuenfeld und Regina Uhlmann haben mir durch viele nützliche Handgriffe und methodische Fertigkeiten das Arbeiten erleichtert und legten oft eine wertvolle Grundlage für weitere Experimente.

Herrn Dr. Andreas Rump danke ich für den kommunikativen Ideenaustausch, die Metaphase FISH Analysen und hoffe auf eine weitere interessante Kooperation. Frau PD Dr. Sigrid Tinschert möchte ich für die humangenetische Betreuung und Rekrutierung der Patienten danken. Herr Dr. Sigmar Stricker führte die notwendigen *in situ* Hybridisierungen durch, deren Ergebnisse offene Fragen aufklärten. Jan Ebert und Jörg Schönheit danke ich für zellbiologische Tips, Hilfestellung bei ChIP Experimenten und Reporterassays und Antikörper Aliquots.

Bei Henrike Maatz und Judith Fischer fand ich stets wissenschaftlichen Austausch zwischen Doktoranden und freizeitbezogene Abwechslung, die mich inspirierten und anspornten.

Unabhängig vom Laboralltag, gilt es denen zu danken, die mir Mut, Kraft und Kritik gaben und zu meiner persönlichen Weiterentwicklung beigetragen haben.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich für das immerwährende Interesse an dieser Arbeit und die nie mangelnden Ratschläge. Ich danke ihnen von Herzen, dass sie diese Dissertation immer unterstützten und für die vermittelten Erfahrungen, die zu meiner weiteren Entwicklung beigetragen haben. Danke, dass ihr mir immer Mut zugesprochen und der schier unendlichen Langatmigkeit entgegengewirkt habt.

Laura Sauer möchte ich von ganzem Herzen danken, dass sie die Arbeitsweise und Laune eines experimentell arbeitenden Wissenschaftlers ausgehalten hat und zwischendurch genug Kraft fand, mir mit Ausgleich und entspannender Abwechslung zu helfen. Ich danke Dir, dass Du immer zu mir gehalten und an mich geglaubt hast. Du hast mich bei experimentellen Durststrecken und forschungsbedingten Rückschritten immer meinen Ansporn wieder finden lassen und konntest meiner nahenden Verzweiflung Parole bieten.

Meinem langjährigen vertrauten Freund und Mitstreiter Martin Vaegler danke ich für entspannende Stunden mit illustren Klangwelten und für nächtliche Gespräche. Ich wusste ihn immer mit Ehrlichkeit, Rat und Tat an meiner Seite. Martin Geisler danke ich für sein Interesse, seinen Humor und unsere kulinarischen Aktivitäten, die mich den ein und anderen Abend während der finalen Phase entspannt haben. Aline Sauer danke ich für den konstant herzlichen Spass und die Berliner Entspannung. Vielen lieben Dank an die Tübinger Familie und Carsten Köwitsch für die langjährige Freundschaft.

Ich danke den Gutachtern, dem Promotionsausschuss und allen anderen, die zum erfolgreichen Abschluss dieser Dissertation beigetragen haben.

Zuletzt sei Herrn Professor Stefan Mundlos für die hilfreiche Vorbereitung und Begutachtung meines Stipendienantrags und dem Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin Buch gedankt, dessen 3-jähriges Stipendium mich finanzierte. Die DFG unterstützte dieses Projekt durch den Drittmittelantrag BA1773/5-1.

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Berlin, den 15.04.2009

Philipp G. Maaß